



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN AMBIENTE,  
PREVENZIONE E MEDICINA PUBBLICA (XX ciclo)  
Coordinatore Prof. Claudio Buccelli**

**INDIRIZZO SCIENZE BIOLOGICHE FORENSI**

**TECNICHE DI SPETTROMETRIA DI MASSA NELLA RICERCA DI  
SOSTANZE STUPEFACENTI ED IN PARTICOLARE  
DELLE “NEW CLUB DRUGS”**

Tesi di Dottorato

**Tutor**

**Ch.mo Prof. Antonio Acampora**

**Dottoranda**

**Loredana Castiglia**

Anno 2006-2007

# INDICE

|  |            |           |
|--|------------|-----------|
| <b>INTRODUZIONE</b>  | <b>PAG</b> | <b>4</b>  |
| <br>   |            |           |
| <b>1. FARMACI AD USO VOLUTTUARIO</b>   |            | <b>6</b>  |
| 1.2 DROGHE DI ABUSO  |            | 7         |
| 1.2.1 SOSTANZE STUPEFACENTI DI ORIGINE NATURALE:<br>EFFETTI TOSSICOLOGICI, DIPENDENZA E ASTINENZA<br><i>CANNABIS, COCAINA, HEROINA</i> |            | 8         |
| 1.2.2 LE NUOVE SOSTANZE STUPEFACENTI   |            | 15        |
| 1.2.2.1 NEW CLUB DRUGS   |            | 15        |
| <i>L'ACIDO <math>\gamma</math>-IDROSSIBUTIRRICO: EFFETTI TOSSICOLOGICI</i>   |            | 17        |
| 1.3 FARMACOCINETICA E METABOLISMO  |            | 21        |
| 1.3.1 METABOLISMO E CINETICA DI ELIMINAZIONE DELLE<br>SOSTANZE STUPEFACENTI: CANNABIS, COCAINA E<br>HEROINA                            |            | 21        |
| 1.3.2 METABOLISMO E MECCANISMO DI AZIONE<br>DELL'ACIDO $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO  |            | 27        |
| <br>   |            |           |
| <b>2. LEGISLAZIONE</b>   | <b>PAG</b> | <b>32</b> |
| 2.1 LEGISLAZIONE IN AMBITO NAZIONALE   |            | 32        |
| 2.2 REGOLAMENTAZIONI INTERNAZIONALI<br>DELL'ACIDO $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO   |            | 33        |
| 2.3 ASPETTI FORENSI  |            | 33        |
| <br>   |            |           |
| <b>3. METODI DI ANALISI</b>  | <b>PAG</b> | <b>34</b> |
| 3.1. LE MATRICI COMPLESSE  |            | 34        |
| 3.1.2 ANALISI DEGLI STUPEFACENTI NELLE URINE   |            | 34        |
| 3.1.2 ANALISI DEL CAPELLO  |            | 36        |
| 3.1.3 MECCANISMO DI INCORPORAZIONE ED ESTRAZIONE<br>DELLE "DROGHE DAL CAPELLO"   |            | 37        |
| 3.2 CUT OFF ANALITICO  |            | 40        |

|   |  |    |
|---|--|----|
| <b>SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA</b>    | PAG  | 42 |
| <b>4. PROCEDURE, MATERIALI E METODI</b> | PAG  | 44 |
| <i>PRESUPPOSTI TEORICI</i>              |  |    |
| 4.1                                     | PARAMETRI DI VALIDAZIONE DEL DATO ANALITICO  | 44 |
| 4.1.1                                   | LIMITI DI SENSIBILITÀ E DI QUANTIFICAZIONE   | 45 |
| 4.1.2                                   | PRECISIONE E ACCURATEZZA   | 45 |
| 4.2                                     | ESTRAZIONE DEGLI ANALITI DALLA MATRICE COMPLESSA   | 46 |
| 4.2.1                                   | ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO   | 46 |
| 4.2.2                                   | ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA  | 74 |
| 4.3                                     | GAS CROMATOGRAFIA  | 47 |
| 4.3.1                                   | RIVELAZIONE DEGLI ANALITI  | 49 |
| 4.3.1.1                                 | SPETTROMETRIA DI MASSA   | 49 |
| 4.3.1.2                                 | IONIZZAZIONE ELETTRONICA ED ELECTROSPRAY   | 50 |
| <i>MODALITÀ DI ACQUISIZIONE</i>         |  |    |
| 4.3.1.3                                 | MODALITÀ <i>FULL-SCAN</i> E A SCANSIONE DI IONI SELEZIONATI (SIM)  | 51 |
| 4.3.1.4                                 | SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS-MS)  | 53 |
| 4.4                                     | GAS CROMATOGRAFIA ACCOPPIATA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA CON IONIZZAZIONE ELETTRONICA (GC/EI-MS)               | 54 |
| 4.5                                     | ANALISI QUANTITATIVA   | 55 |
| 4.5.1                                   | STANDARD INTERNO E CURVE DI CALIBRAZIONE   | 55 |
| <b>5. PROCEDURE ANALITICHE</b>          | PAG  | 57 |
| 5.1                                     | REATTIVI E STRUMENTAZIONE  | 57 |
| 5.2                                     | SOLUZIONI DEGLI ANALITI  | 57 |
| 5.2.1                                   | SOLUZIONI A TITOLO NOTO:<br>METANOLICHE E IN MATRICI COMPLESSE   | 58 |
| 5.2.2                                   | TRATTAMENTO DEI CAMPIONI URINARI E IN MATRICE CHERATINICA  | 59 |
| 5.3                                     | CONDIZIONI ANALITICHE  | 61 |
| 5.3.1                                   | ESTRAZIONE DEGLI ANALITI DALLA MATRICE CHERATINICA E DALLE URINE: ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO E IN FASE SOLIDA. | 61 |
| 5.3.2                                   | REAZIONE DI DERIVATIZZAZIONE   | 62 |
| 5.3.3                                   | RIVELAZIONE DELL'ACIDO $\gamma$ -IDROSSIBUTIRICO MEDIANTE LC/ESI/MS  | 64 |
| 5.3.4                                   | RIVELAZIONE DEGLI ANALITI MEDIANTE ANALISI   | 64 |

## GC/EI-MS, MS-MS E SIM

|  |     |     |
|--|-----|-----|
| <b>6. RISULTATI</b>  | PAG | 67  |
| 6.1 GHB: EQUILIBRIO CON LA FORMA LATTONICA   |     | 67  |
| 6.2 DERIVATIZZAZIONE   |     | 72  |
| 6.3 OTTIMIZZAZIONE DELLA GAS CROMATOGRAFIA   |     | 73  |
| 6.3.1 SPETTRI DI MASSA EI/FULL-SCAN DEI SILIL-<br>DERIVATI                               |     | 75  |
| 6.3.2 SPETTRI DI MASSA EI-SIM  |     | 81  |
| 6.3.3 SPETTRI DI MASSA GC/ EI-MSMS   |     | 82  |
| 6.4 QUANTIFICAZIONE DEGLI ANALITI  | PAG | 84  |
| 6.4.1 LIMITI DI SENSIBILITÀ. LINEARITÀ DELLA<br>RISPOSTA. COEFFICIENTI DI CORRELAZIONE   |     | 84  |
| 6.4.2 PRECISIONE E ACCURATEZZA   |     | 85  |
| 6.5 DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE STUPEFACENTI IN<br>SOGGETTI DEDITI ALL'ABUSO DI DROGHE |     | 92  |
| <b>DISCUSSIONE</b>   |     | 97  |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>  |     | 104 |
| <b>ABBREVIAZIONI</b>   |     | 108 |

## INTRODUZIONE

Il “fenomeno droga” nasce e si alimenta in contesti sociali in cui interagiscono vari fattori culturali, giuridici, sanitari ed economico-finanziari.

Negli ultimi anni, si è assistito ad un incremento dell’uso di sostanze stupefacenti e ad un mutamento delle ragioni socio-psicologiche, che motivano l’approccio alle sostanze stupefacenti.

In Italia, ad esempio, si è passati dalla generazione sessantottina, che in un periodo di forte tensione politico-sociale ha trovato nella droga un mezzo di ribellione, agli adolescenti ed emarginati degli anni ’80, sedotti dal mito della droga nella speranza di trovare serenità e felicità, in una società basata sul successo economico e sull’individualismo.

Il mutamento del “fenomeno droga” vede, rispetto agli anni precedenti, il diminuire dell’abuso di eroina, l’incremento dell’uso di cocaina, la diffusione della cocaina nei ceti sociali più svariati (prima considerata droga “*d’élite*”), e nell’introduzione sul mercato illecito di nuove droghe di abuso di origine sintetica, denominate “*Club drugs*”. Con questo termine sono indicate in particolare le sostanze adoperate prevalentemente nei diversi luoghi di aggregazione. In questo gruppo di stupefacenti sono incluse numerose sostanze, tra cui l’ecstasy, l’acido  $\gamma$ -idrossibutirrico e la chetamina. Le “*Club drugs*” generalmente sono definite droghe di nuova “generazione”; tra queste, una particolare attenzione vada rivolta all’acido  $\gamma$ -idrossibutirrico, definito anche “droga da stupro”, perché assunto in dosi elevate provoca perdita della coscienza ed amnesia temporanea. Negli ultimi anni in America ed in Europa<sup>1-3</sup>, infatti, l’acido  $\gamma$ -idrossibutirrico è stato adoperato a scopi di violenza sessuale: sciolto in bevande alcoliche e/o analcoliche è assunto involontariamente dalle potenziali vittime che, dopo violenza subita, non hanno ricordo dell’accaduto, e, quindi, non denunciano gli aggressori, creando un vero e proprio allarme sociale.

L’aumento dell’abuso di sostanze stupefacenti ha trovato, negli ultimi decenni, la sua larga diffusione anche in ambiti lavorativi, soprattutto da parte di soggetti il cui lavoro implica elevata responsabilità nei confronti della collettività. Le ragioni che spesso spingono l’uomo ad adoperare composti ritenuti illeciti, prima, durante e dopo i turni lavorativi, sono molte volte scatenate dai ritmi di vita sempre più veloci, dettati dall’esigenza dell’uomo di avere un’esistenza sempre più agiata e dal desiderio di conquistare posizioni sociali di notevole importanza. Ciò sottopone continuamente il soggetto ad elevati livelli di stress quotidiano. In

quest'ambito, il lavoratore affronta la sindrome da stress con l'uso voluttuario di antidepressivi, ansiolitici, sedativi di vario genere e di sostanze stupefacenti. È in questo contesto, ad esempio, che la cocaina ha trovato il suo largo impiego anche nei soggetti di età adulta con elevate responsabilità, lavorative e sociali.

L'accertamento, ripetuto nel tempo, dell'abuso di sostanze stupefacenti per i soggetti il cui incarico lavorativo copre mansioni di elevata responsabilità non è, ancora oggi, obbligatorio. Tuttavia, il D.P.R. n. 309/90, "Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza"<sup>4</sup>, stabilisce quali sono le sostanze stupefacenti o psicotrope sottoposte alla vigilanza ed al controllo del Ministero della Salute, raggruppate in sei tabelle sottoposte a continuo aggiornamento e, inoltre, la Conferenza Unificata ha ratificato, ultimamente, l'intesa per prevedere controlli periodici su l'eventuale uso di sostanze stupefacenti o psicotrope, a garanzia della salute e della sicurezza dei lavoratori con mansioni che possono comportare rischi per se e per i cittadini<sup>5</sup>.

In quest'ambito le indagini condotte con varie metodiche analitiche rappresentano un valido sistema per monitorare categorie a rischio, come ad es. piloti o autisti di mezzi pubblici per dimostrare la responsabilità di individui colpevoli di aver causato gravi incidenti stradali, per cause civili relative alla custodia dei figli, alle adozioni, alle pratiche di separazione e/o divorzio, in ambito sportivo (doping), ed anche per l'interpretazione nei casi di morte dovuti ad intossicazioni acute da sostanze stupefacenti<sup>6</sup>.

## 1. FARMACI DI USO VOLUTTUARIO

Il termine inglese *drug abuse* implica un dissenso sociale e può avere significati differenti per persone diverse. Inoltre, andrebbe distinto l'abuso di un farmaco da un "cattivo uso". Per abuso si dovrebbe intendere qualsiasi uso di un farmaco per scopi non medici, quasi sempre allo scopo di modificare lo stato di coscienza. In questo caso la natura del farmaco può non essere importante rispetto alle modalità d'uso. Mentre, il "cattivo uso" prevede l'assunzione del farmaco seguendo un'indicazione sbagliata, a dosaggi errati o per periodi troppo lunghi.

Per entrambi i casi l'assunzione voluttuaria porta dipendenza psichica o fisica. La dipendenza psichica si manifesta con comportamento di ricerca compulsivo a causa del quale un soggetto usa ripetutamente il farmaco per soddisfazione personale. Ne è un esempio il fumo di sigaretta. La dipendenza fisica si manifesta nel momento in cui l'astensione dal farmaco produce effetti che sono, spesso, opposti a quelli desiderati dal soggetto. Cioè, l'organismo si adatta a nuovi livelli omeostatici durante i periodi di assunzione del farmaco, tuttavia, quando questo equilibrio viene turbato (disuso del farmaco), l'organismo reagisce in modo opposto. Di conseguenza, il soggetto involontariamente sente l'esigenza di assumere dosi sempre più elevate di farmaco per raggiungere gli stessi effetti. La sindrome di astinenza da alcool è forse l'esempio più comune, ma si possono osservare lievi effetti di astinenza anche in persone che assumono ogni giorno notevoli quantità di caffè<sup>7</sup>.

## **1.2 DROGHE DI ABUSO**

Ogni società accetta alcuni farmaci come leciti e ne bandisce l'uso di altri perché considerati illeciti. Ad esempio negli U.S.A. e nella maggior parte dell'Europa, le “droghe nazionali”, rappresentate dalla caffeina, dalla nicotina, e dall'alcool sono considerate illecite. Così come la cannabis e la cocaina.

Tuttavia, esistono stati del Medio Oriente in cui queste sostanze sono comprese tra quelle lecite. Alcune tribù di Indiani d'America, ad esempio, adoperano legalmente un'allucinogeno (il peyote) per scopi religiosi. Nelle Ande la cocaina viene utilizzata per sedare la fame e per migliorare la possibilità di eseguire i lavori pesanti<sup>8</sup>.

La conoscenza scientifica ha un'importanza predominante per includere le sostanze nelle categorie degli illeciti, tuttavia, molte realtà sociali mostrano una maggiore attenzione alle conseguenze sociali dell'abuso. Basta pensare alle percentuali molto alte di casi di incidenti stradali, casi legali di custodia dei figli, alle adozioni, alle pratiche di separazione e di divorzio, che sono spesso deputabili all'uso di sostanze recanti alterazioni psico-fisiche sull'organismo.

In Italia, sono considerate droghe di abuso tutti quei composti naturali o di sintesi, che pur non avendo alcun effetto terapeutico sono adoperate volontariamente e determinano degli effetti sul piano comportamentale del soggetto tali da avere ripercussioni sul piano sociale<sup>4</sup>. Alcuni di questi composti sono estratti e purificati da piante (oppio, cocaina, cannabis), mentre, altri sono prodotti di laboratorio (amfetamine, acido-γ-idrossibutirrico).



### 1.2.1 SOSTANZE STUPEFACENTI DI ORIGINE NATURALE: EFFETTI TOSSICOLOGICI, DIPENDENZA E ASTINENZA

#### *LA CANNABIS*

La *Cannabis* è una pianta probabilmente originaria dell'Asia Centrale e si trova in natura sia a germinazione spontanea, sia in coltivazione<sup>7</sup>.

Le sommità fiorite della *Cannabis sativa* forniscono la maggior parte della sostanza stupefacente. La **marijuana** risulta essere un miscuglio di infiorescenze pressate della pianta; mentre la resina estratta dalla pianta un prodotto maggiormente attivo denominato **hashish** (Fig. 1).

La droga fu certamente nota ai greci al culmine della loro civiltà, come pure ai popoli arabi qualche tempo dopo. Si calcola che circa 200-300 milioni di persone fanno uso della canapa indiana sotto varie forme. Pertanto, sembra essere una delle droghe più antiche e più largamente usata tra quelle psicoattive. L'aumento del consumo negli U.S.A. è stato notevole sin dal 1960 ed è stato calcolato che dei 30-40 milioni di persone che adoperano la droga, un numero riguardevole sono consumatori abituali. Inoltre, dati allarmanti arrivano anche dai risultati di recenti inchieste: nell'ultimo decennio, l'età dei soggetti iniziati all'uso di *Cannabis* ha subito un notevole calo (a 13 anni) e la sua diffusione ha conquistato anche soggetti di età compresa tra i 30-50 anni<sup>8</sup>.

La biosintesi dei principi attivi della *Cannabis sativa* inizia con la formazione del cannabidiolo (CBD), in un secondo momento si forma il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC) e termina con il cannabinolo (CBN). Tuttavia, sebbene esistono molte varianti strutturali dei cannabinoidi, ricavati dalla pianta o prodotti di sintesi di laboratorio, l'attività sulla psiche è deputata esclusivamente al  $\Delta^9$ -THC. Nella maggior parte delle piante il contenuto di  $\Delta^9$ -THC si aggira intorno all'1-2%; alcune linee genetiche possono portare anche ad un prodotto pari al 4-6% di sostanza ben selezionata. La varietà di effetti farmacologici del  $\Delta^9$ -THC fa pensare ad azioni simili a quelle delle amfetamine, LSD, alcool, sedativi, atropina o morfina, tuttavia, piccole dosi possono dare effetti sovrapponibili a quelli di un "placebo".

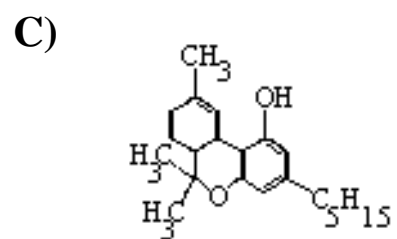
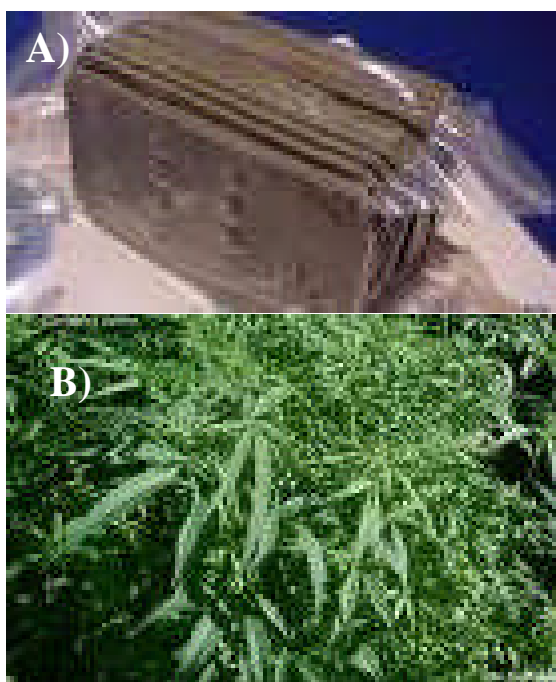
Nel primo stadio si manifestano effetti quali euforia, risata convulsa, alterazione della nozione di tempo, uno stato di depersonalizzazione e vista più acuta. L'effetto si ottiene dopo 2 o 3 inalazioni e dopo le successive si ottiene l'amplificazione degli stessi effetti, raggiungendo un picco massimo dopo 20 minuti dalla sospensione della "fumata". In seguito il consumatore va incontro a rilassamento, esperienze introspettive, stato soporoso, se non proprio sonno reale.

I segni caratteristici dello stato inebriante sono caratterizzati dall'aumento della frequenza del polso e il rossore congiuntivale. In particolare quest'ultimo segno si evidenzia a concentrazioni plasmatiche rivelabili. Possono manifestarsi calo della forza muscolare, tremori, instabilità ed accentuazione dei riflessi tendinei profondi<sup>8</sup>. La maggior parte degli effetti svanisce dopo 3 ore, durante le quali le concentrazioni plasmatiche delle sostanze sono basse. Il massimo degli effetti dopo somministrazione orale può manifestarsi anche dopo 3 o 4 ore dall'assunzione e può durare per 6-8 ore.

L'abitudine è stata ampiamente dimostrata sugli animali, mentre, nell'uomo si verifica solo fra i consumatori per lungo tempo di elevate quantità di droga. Si sviluppano diversi gradi di abitudine in relazione ai differenti effetti della sostanza; l'abitudine nei riguardi dell'effetto di tachicardia acuta si sviluppa abbastanza velocemente.

Una blanda sindrome di astinenza è stata evidenziata solo in seguito a uso frequente di alte dosi di  $\Delta^9$ -THC<sup>8</sup>.

**FIGURA 1.** *CANNABIS SATIVA*: PANNELLO A) MODALITÀ DI ASSUNZIONE DELLA *CANNABIS SATIVA*: HASHISH; PANNELLO B) PIANTA DI MARIJUANA; PANNELLO C) IL PRINCIPIO ATTIVO: TETRAIDROCANNABINOLO



## LA COCAINA

La cocaina, nota da oltre un secolo come anestetico locale di indubbia efficacia, è un derivato del tropano e si ottiene dalle foglie di una pianta del Sud–America, la *Erythroxylon coca*, per lungo tempo adoperata come stimolante dagli indiani delle Ande. La masticazione delle foglie di coca produce effetti piuttosto blandi in seguito ai bassi livelli ematici raggiunti<sup>9</sup>; pertanto questa modalità di assunzione ha prodotto nel tempo pochi o nessun fenomeno d'abuso. A partire dalla fine del XIX secolo, quando è stata isolata la cocaina cloridrato dalle foglie di coca, si è resa possibile l'estrazione della coca in forma pura, il che ha permesso l'assunzione di dosi elevate della sostanza per ingestione orale o assorbimento attraverso la mucosa nasale (Fig.2). Tali vie permettono il raggiungimento di alti livelli ematici, paragonabili a quelli ottenuti mediante somministrazione endovenosa; l'evidente senso di benessere che ne consegue è in grado di indurre un comportamento compulsivo caratteristico del fenomeno della tossicodipendenza<sup>8</sup>.

Le caratteristiche di dipendenza da cocaina sono notevolmente diverse rispetto a quelle da eroina. L'effetto sistemico della cocaina si realizza attraverso una stimolazione del Sistema Nervoso Centrale che si manifesta con eccitazione, potenziamento delle capacità mentali, diminuzione del senso di fatica. Tuttavia, la cocaina non dà alcuna sindrome di astinenza caratteristica in quanto non genera dipendenza fisica (come l'eroina) ma solo una forte dipendenza psichica<sup>8</sup>; infatti, i soggetti che ne interrompono l'uso mostrano in genere depressione, insonnia, paranoia, agitazione, patema d'animo, salivazione, nausea e vomito.

La coca, quindi, rappresenta il classico esempio di sostanza che, senza provocare né tolleranza (diminuzione degli effetti dopo somministrazione ripetuta di uno stesso farmaco) né dipendenza fisica, può determinare un profondo e pericoloso tipo di abuso dovuto al raggiungimento di uno stato di eccitazione, euforia, irritabilità e impulsività tali, da rendere il tossicomane capace di reazioni inconsulte e antisociali.

## *L'EROINA*

La Farmacopea Ufficiale X edizione definisce l'oppio come il "... lattice ottenuto per incisione delle capsule, non ancora mature, ma a completo sviluppo di *Papaver Somniferum*". Tale lattice, una volta prelevato dalla capsula della pianta, viene essiccato e polverizzato per ottenere l'oppio in polvere che contiene numerosi alcaloidi; tuttavia solo alcuni, tra cui la morfina, spiccano per le proprie caratteristiche farmacologiche<sup>8</sup>.

La morfina viene considerata il prototipo dei farmaci ad azione narcotico – analgesica, ma chi domina la scena del mercato degli stupefacenti e dell'abuso e dipendenza da "droga", è il suo principale derivato semisintetico – l'eroina (3,6-diacetilmorfina) –.

Quest'ultima fu sintetizzata nel 1874 da Wright mediante acetilazione della morfina allo scopo di chiarirne la struttura e solo nel 1889 si iniziò a produrre eroina per fini illeciti su vasta scala. In passato, l'eroina da strada mostrava un'azione molto limitata, in quanto ogni dose da 100 mg di polvere conteneva all'incirca 4 mg di stupefacente, mentre il resto era costituito da materiale inerte e talvolta anche da adulteranti tossici come il chinino. Attualmente, il grado di purezza dell'eroina normalmente presente sul mercato degli stupefacenti ha raggiunto un valore che va dal 45% fino all'80%<sup>9</sup>. Ciò dimostra come il livello di dipendenza fisica tra gli eroinomani sia cambiato ma soprattutto aumentato rispetto al passato. Inoltre, anche le diverse forme di somministrazione adottate hanno contribuito ad incrementare il numero degli individui che ne fanno uso. Infatti, mentre in passato l'unica forma di somministrazione dell'eroina era l'iniezione endovenosa, attualmente lo stupefacente viene assunto anche per via inalatoria, eliminando qualsiasi remora connessa con la presenza di evidenti segni di puntura e ampliando, quindi, il numero di persone dedite all'uso abituale di "droghe" (Fig.2).

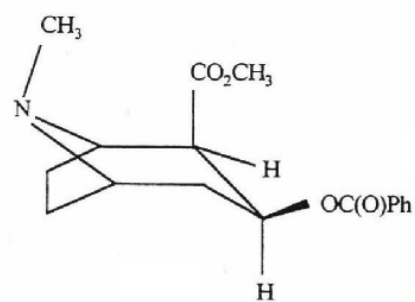
L'eroina si ottiene per esterificazione con anidride acetica dei gruppi polari idrossilici in posizione C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub><sup>8</sup>. L'introduzione di gruppi acetilici aumenta il grado di lipofilia della molecola, facilitando l'attraversamento della barriera ematoencefalica; di conseguenza, a parità di dose assunta, la concentrazione di eroina - e quindi anche l'intensità dell'azione narcotizzante - risulta maggiore, rendendo l'uso di eroina a scopo voluttuario preferibile rispetto a quello della morfina stessa. Gli effetti principali derivanti dall'assunzione di eroina (o morfina) si esplicano soprattutto a livello del Sistema Nervoso Centrale, producendo analgesia, sonnolenza, variazioni dell'umore, offuscamento mentale e, ad alte dosi, deprimendo il sistema respiratorio a livello bulbare. Tali effetti vengono ad essere minimizzati quando l'uso diventa cronico<sup>8</sup>.

L'assunzione di eroina provoca oltre ad una dipendenza psichica, che si manifesta con un desiderio indomabile a continuare ad assumere la droga e a procurarsela con ogni mezzo, una non meno marcata dipendenza fisica, che aumenta di intensità con l'aumento della dose che comporta un fabbisogno continuo della "droga" al fine di mantenere un'apparente omeostasi e, quindi, prevenire la caratteristica sindrome di astinenza. Per lo sviluppo della dipendenza fisica occorrono generalmente due settimane ma in alcuni casi anche pochi giorni<sup>9</sup>.

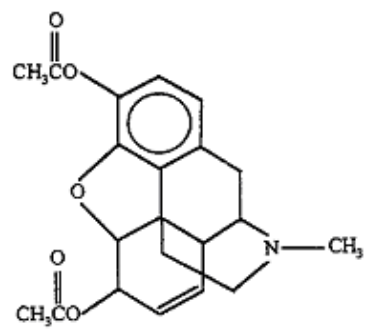
Nel soggetto che assume cronicamente eroina la sindrome di astinenza raggiunge il massimo di intensità in 24 – 48 ore. I segni di questa sindrome si manifestano con lacrimazione, sudorazione, tremori, anoressia, midriasi, insonnia, accresciuta frequenza del respiro, vomito, coliche e diarrea, sensazione di freddo alternata con abbondante sudorazione etc. Tali fenomeni tendono a regredire nel giro di 3 – 4 giorni. A questa "sindrome di astinenza primaria" segue una "sindrome post - astinenziale", di più lunga durata, caratterizzata da ansia, depressione e irrefrenabile desiderio di assumere lo stupefacente. A tale quadro va aggiunta, infine, l'insorgenza del fenomeno della tolleranza che si manifesta con la necessità di aumentare la dose per ottenere gli effetti farmacologici iniziali<sup>9</sup>.

**FIGURA 2.** PANNELLO A) MODALITÀ DI ASSUNZIONE E STRUTTURA MOLECOLARE DELLA COCAINA; PANNELLO B) MODALITÀ DI ASSUNZIONE E STRUTTURA MOLECOLARE DELLA EROINA

A)



B)



### 1.2.2 LE NUOVE SOSTANZE STUPEFACENTI

Le droghe sintetiche sono le sostanze stupefacenti maggiormente diffuse nei luoghi di aggregazione frequentati, spesso, da adolescenti.

Esse sono prodotti di laboratori clandestini sintetizzate da soggetti che non possiedono le competenze chimiche necessarie (in gergo sono denominati "chimici di strada") e, quindi, risultano essere sostanze di equivoca composizione<sup>10</sup>. Molti composti determinano nel soggetto un'intensificazione dell'emotività, con enfattizzazione delle sensazioni accompagnata da torpore e rilassamento.

L'assuntore molte volte, in seguito all'uso degli illeciti, interagisce con gli altri abbattendo le usuali barriere che tendono a mantenere uno scambio sociale ad un livello formale. Utilizzate principalmente in modo ricreazionale, dunque, le nuove sostanze di abuso si presentano con differenti nomi e forme. Inoltre, non è da sottovalutare che molti soggetti sono dediti all'abuso di sostanze di diversa natura ingerite contemporaneamente, sottovalutando il potenziamento degli effetti collaterali e, di conseguenza, dei pericoli che tali miscugli possono recare all'organismo. Non a caso, molti decessi per droghe sono quasi sempre legati a miscugli di più sostanze.

Attualmente diversi studi sono incentrati sugli effetti neurotossici, sia acuti, sia lungo termine, delle singole sostanze stupefacenti e quelli ottenuti se combinate con le sostanze di origine naturale, come la *Cannabis* o la cocaina, oppure associate a bevande alcoliche<sup>10</sup>.

#### 1.2.2.1 NEW CLUB DRUGS

La definizione di New Club Drugs è concettualmente opposta al fenomeno dell'abuso di sostanze stupefacenti come l'eroina, la quale è definita una "droga di isolamento". Infatti, il fenomeno delle New Club Drugs include tutte le sostanze di recente scoperta o di recente introduzione sul mercato clandestino i cui effetti ricadono sul piano comportamentale dell'assuntore, associate ai luoghi di aggregazione<sup>10</sup>.

In questa definizione sono incluse altre diverse denominazioni delle nuove droghe di abuso che differiscono per modalità di assunzione, per le categorie di sostanze coinvolte e dalla forma commerciale in cui si presentano (luquido, pastiglie, pillole, ecc.). Con il termine di "droghe *entactogene*" si sottolineano le proprietà dell'ecstasy e dei suoi analoghi ad indurre uno stato psicologico tale da aumentare le capacità introspettive del soggetto. Le "*smart drugs*", invece, sono sostanze di nuova generazione immesse sul mercato per adempiere alle



esigenze del consumatore, in quanto si presentano come pillole di piccole dimensioni, quindi, facilmente ingeribili. Numerosi composti rientrano in questa definizione, sia di origine naturale, sia di origine sintetica. Molti di questi hanno proprietà rilassanti e aumentano la libidine sessuale. Il prodotto diffuso maggiormente è l'“herbal-XTC”, ecstasy vegetale. Questi preparati hanno attinto abbondantemente dalla antropologia e dalla medicina alternativa etnica riabilitando e riproponendo l'utilizzo di sostanze vegetali ricavate da erbe e piante.

Un'altra classe di droghe associate alla definizione di New Club Drugs sono le “*Designer drugs*”, che comprendono un ventaglio di sostanze ampiamente conosciute, manipolate nei laboratori clandestini, allo scopo di ottenere nuovi prodotti con effetti analoghi. La mescalina e i suoi analoghi, la 3,4-metilendiossi-metilamfetamina (MDMA), la 2,5-dimetossi-4-brom-amfetamina (DOB), gli oppiacei di sintesi (Fentanyl e derivati) e meperidina, rientrano in questa definizione<sup>10</sup>.

Il termine “*Club drugs*”, raggruppa sostanze diverse tra loro, accomunate da modelli di consumo che eleggono come scenario privilegiato le discoteche, i rave e simili. Rientrano in questa definizione l'ecstasy (MDMA), l'acido  $\gamma$ -idossibutirrico (GHB) e la Ketamina (KET). Le “*Recreational drugs*” non si discostano dalle precedenti pur mantenendo un carattere di minore specificità. L'accento viene posto sui patterns di consumo. Accanto ad ecstasy ed analoghi una posizione centrale è data dal GHB; sostanza che rientra anche nel termine di “*Date Rape drugs*” in quanto è una delle droghe associate a violenze sessuali<sup>11</sup>. Accanto al GHB rientra nella definizione anche il Flunitrazepam.

Infine abbiamo il termine generico di “*Psicoattivi*” con il quale si allude a tutto il panorama di sostanze la cui assunzione comporta delle ricadute sul piano comportamentale percettivo in termini di alterazioni degli stati della coscienza. Il termine costituisce per certi versi un sinonimo di droga, il suo utilizzo è più ricorrente per tutte quelle sostanze che hanno tra gli effetti caratteristiche psichedeliche<sup>10</sup>.

Negli ultimi decenni la grande diffusione, quali e quantitativa, di prodotti stupefacenti di sintesi nei mercati clandestini ha creato dei veri e propri modelli di consumo al fine di divulgare le sostanze nei luoghi di interazione. In letteratura questi modelli sono stati distinti in base agli effetti sull'organismo e ai diversi contesti sociali di abuso<sup>11</sup>.

Individuata la presenza dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico (GHB) nel cervello dei mammiferi, nei primi anni '60 in Francia, fu sintetizzato e adoperato come anestetico generale per ridurre l'astinenza da alcool<sup>13</sup>. Ben presto divenne una sostanza utilizzata in ambiti sportivi per le sue attività anabolizzanti (è uno stimolatore dell'ormone della crescita, aiuta a perdere peso e ad aumentare il volume muscolare) e pochi anni dopo si diffuse nei *rave party* e nelle discoteche, come sostituto di alcool, ecstasy e amfetamine<sup>14</sup>.

Il consumo di GHB, può determinare un'intossicazione grave e potenzialmente letale. La Drug Enforcement Administration (DEA)<sup>15</sup>, sezione del dipartimento di giustizia americano, riferisce ufficialmente di 71 morti e 5700 ricoveri per overdose dal 1990 al 2000<sup>15, 17</sup>. Per i servizi di emergenza americani sono stati ad esempio calcolati in totale 2973 ricoveri per abuso da GHB nel solo 1999<sup>18</sup>.

Denominato “ecstasy liquida”, “filtro d'amore”, “Gamma OH”, “Fantasy”, Liquid X, Scoop, Goop, G, si presenta come liquido incolore, ha un odore leggermente pungente e si scioglie facilmente in qualsiasi tipo di bevanda. I suoi sali, invece, si presentano in forma solida e si ottengono per aggiunta di soda caustica (NaOH) o potassica (KOH). Sia l'acido che i sali sono solubili in acqua e sono commercializzati sottoforma di soluzioni concentrate contenute in bottigliette rese attrattive da coloranti che conferisce loro una colorazione fluorescente<sup>18</sup>.

Basse dosi di GHB producono uno stato di rilassamento e tranquillità, aumento della sensualità, dell'euforia e della loquacità: effetti molto simili a quelli dell'alcool. Le sensazioni piacevoli compaiono mezz'ora dopo la sua assunzione, scompaiono dopo circa tre ore e possono essere prolungate da basse dosi ingerite più volte. Gli effetti sono dose-dipendente e basta un piccolo aumento della quantità assunta per ottenere un elevato incremento dell'effetto; a ciò va aggiunto che la differenza tra dose-stupefacente e dose-tossica è molto modesta: da un effetto di piacevole stordimento si può passare inconsapevolmente e rapidamente a uno stato di incoscienza, al quale possono seguire gli effetti tossicologici. Tale sostanza porta dipendenza fisica e la disintossicazione produce una sindrome d'astinenza caratterizzata da insonnia, ansia, tremori e crampi muscolari<sup>1,2</sup>.

La gravità e la durata dell'overdose da GHB dipendono dalla dose assunta; solitamente si risolve in modo spontaneo entro 2-96 ore e le prime due ore dopo l'ingestione sono le più critiche. La sintomatologia comprende nausea, vomito, incontinenza urinaria e fecale, vertigini,

bradicardia, ipotensione, ipotermia (la temperatura è inferiore a 34°C nel 30% dei pazienti), depressione respiratoria, apnea, atassia, tremore, convulsioni, sonnolenza, confusione, agitazione, comportamento aggressivo, allucinazioni, diminuzione marcata del livello di coscienza, coma. Durante il coma il paziente reagisce alla stimolazione con un'agitazione marcata. Tipicamente si osserva un recupero spontaneo dello stato di coscienza entro 5 ore. Il paziente si risveglia rapidamente dal coma nel momento in cui la concentrazione nel sangue scende sotto 50 mg/ml e non ricorda nulla dell'accaduto<sup>19-20</sup>. Non ci sono terapie specifiche per l'intossicazione da GHB. Il trattamento medico è essenzialmente mirato a prevenire l'aspirazione, controllare la depressione respiratoria e monitorare i parametri vitali.

Nella tabella di seguito riportata, sono mostrate le dosi e gli effetti del GHB<sup>20</sup>.

| DOSE        | EFFETTI                            |
|-------------|------------------------------------|
| 10 MG/KG    | AMNESIA E IPOTAMIA                 |
| 20-30 MG/KG | SONNO                              |
| 50-70 MG/KG | PROFONDA ANESTESIA E STATO DI COMA |

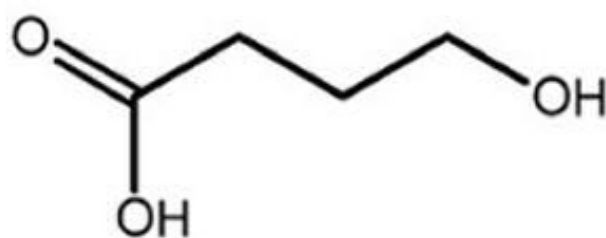
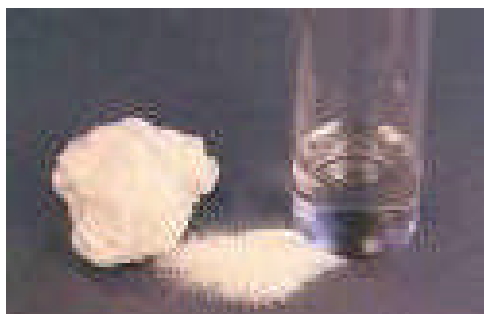
La sua diffusione in Italia interessa soprattutto l'ambito sportivo ma soprattutto quello clinico.

Per molti anni il GHB è stato adoperato come anestetico generale, tuttavia, l'effetto predominante era uno stato ipnotico del paziente (impiegato ufficiosamente anche nelle pratiche ipnotiche)<sup>21</sup>. Spesso, allo scopo di aumentare le proprietà anestetizzanti, al GHB erano associate sostanze della famiglia degli oppioidi. La messa al bando del GHB come anestetico generale fu effettuata in seguito agli studi condotti su cavie anestetizzate con 10 mg/Kg GHB. Tali studi hanno dimostrato che l'effetto collaterale maggiormente marcato erano fenomeni di epilessia<sup>22</sup>.

Successivamente e ancora oggi in Italia e negli U.S.A., viene adoperato nel trattamento di pazienti affetti da narcolessia<sup>23</sup>. Diversi studi hanno dimostrato che dosi di 25 mg/kg riducono significativamente gli attacchi di sonno che il paziente ha durante il giorno. Infatti, la Food and Drug Administration (FDA)<sup>24</sup> permette l'uso del GHB per ridurre il numero degli attacchi di catalessi nei pazienti affetti (Xyrem è il nome commerciale)<sup>25</sup>. Inoltre, in Italia, con il nome di Alcover viene anche adoperato nel trattamento dell'alcolismo<sup>26</sup>. Dati sperimentali hanno

dimostrato che somministrare dosi giornaliere di 50-100 mg/Kg di GHB riduce il desiderio di alcol in quanto riproduce gli effetti positivi gratificanti dell'alcol in maniera graduale e stabile. Questi dosaggi terapeutici vengono somministrati anche tre o più volte al giorno a seconda dei casi<sup>27</sup>.

**FIGURA 3.** MODALITÀ DI ASSUNZIONE E STRUTTURA MOLECOLARE  
DELL' ACIDO  $\gamma$ -IDROSSIBUTIRICO



### 1.3 FARMACOCINETICA E METABOLISMO

Qualunque sia l'origine della sostanza chimica esogena (xenobiotico) che l'uomo può assumere volontariamente o esserne involontariamente esposto, la quantità di sostanza assorbita dall'organismo è distribuita nei vari organi e tessuti in accordo con il suo tempo di vita medio. La biotrasformazione dello xenobiotico produce metaboliti attivi o inattivi che, a loro volta, sono distribuiti nell'organismo dal quale vengono escreti principalmente attraverso feci e urine, in quantità diverse.

In generale gli effetti sulla salute, per qualsiasi sostanza, sono strettamente correlati alle vie e al grado di assorbimento della molecola, alle sue proprietà intrinseche (trasformazione, metabolismo, degradazione, tossicità) e dalla dose assunta.

Di conseguenza, le tecniche analitiche che consentono di diagnosticare un eventuale uso di "droghe" da parte di un individuo si basano non solo sul dosaggio della "droga parente" ma anche dei suoi metaboliti. Infatti, per alcune sostanze di abuso, la presenza della "droga parente" in un campione incognito potrebbe essere correlata ad eventuali contaminazioni esterne e dar luogo, quindi, a falsi positivi, mentre la determinazione dei metaboliti nelle matrici biologiche conferma l'assunzione effettiva della "droga" stessa.

#### 1.3.1 METABOLISMO E CINETICA DI ELIMINAZIONE DELLE SOSTANZE STUPEFACENTI:

##### CANNABIS, COCAINA E EROINA

###### *LA CANNABIS*

La via di assunzione privilegiata della *Cannabis* nei paesi occidentali è il "*fumo*"; mentre, in alcuni paesi orientali la somministrazione avviene prevalentemente per via orale. Assumere questa sostanza mediante via orale comporta un tasso di assorbimento lento e molto variabile, tuttavia, la durata degli effetti è maggiore. Diversi studi di farmacocinetica indicano che la cosiddetta "*fumata*" è in qualche maniera equivalente alla somministrazione endovenosa<sup>7</sup>.

I preparati di *Cannabis* contengono il 95% di tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC) e alte quantità della sua forma acida. L'acido del  $\Delta^9$ -THC (THCCOOH) risulta essere il composto più diffuso in natura e si trasforma molto lentamente nella forma decarbossilata; questa reazione è innescata dal calore sprigionato durante la combustione dello "*spinello*".

Dopo 10 minuti dall'assunzione il  $\Delta^9$ -THC si lega alle proteine plasmatiche, soprattutto nella frazione lipoproteica ( $\alpha$  e  $\beta$  lipoproteine). Dal  $\Delta^9$ -THC si formano diversi metaboliti,

alcuni dei quali hanno un'attività biologica superiore a quella del  $\Delta^9$ -THC. Infatti, quando si raggiunge il picco massimo dell'azione della *Cannabis*, la quantità di  $\Delta^9$ -THC presente nel plasma è molto bassa, mentre i suoi metaboliti sono presenti in elevate quantità.

La rapida distribuzione è stata piegata con la formazione di legami intracellulari di questo composto; infatti, esso è stato trovato localizzato a livello dei nuclei e dei mitocondri, soprattutto sottoforma del suo principale metabolita, l'11-idrossi- $\Delta^9$ -THC. L'identificazione degli altri probabili metaboliti del  $\Delta^9$ -THC è ancora oggi estremamente difficoltosa per le rapide biotrasformazioni reversibili collegate all'assunzione. Molti studi riportano che sono i metaboliti i maggiori responsabili dell'attività farmacologia e degli effetti psichici della pianta, ed i diversi effetti che le singole persone riscontrano nei confronti della *Cannabis* possono dipendere dal rapporto tra  $\Delta^9$ -THC e i suoi metaboliti.

Il metabolismo del  $\Delta^9$ -THC avviene soprattutto nei sistemi enzimatici microsomiali del fegato dove viene prodotto principalmente l'11-idrossi- $\Delta^9$ -THC; mentre 8- $\alpha$ -idrossi- $\Delta^9$ -THC, 8- $\beta$ -idrossi- $\Delta^9$ -THC, 8-cheto- $\Delta^9$ -THC, 9-10-epossido- $\Delta^9$ -THC, 11-carbossi-idrossi- $\Delta^9$ -THC, 11-carbossi-2-idrossi- $\Delta^9$ -THC vengono prodotti nei polmoni. Il  $\Delta^9$ -THC e i suoi metaboliti sono immagazzinati di preferenza negli organi di assorbimento quali fegato polmoni e milza, negli organi influenzati dalla droga, cuore e cervello, negli organi di eliminazione, cioè cistifellea e reni e nei relativi prodotti di escrezione, urina e bile. I metaboliti escreti nella bile vengono successivamente riassorbiti dal tratto gastrointestinale, dimostrando così la presenza di una circolazione enteroepatica. La maggior parte dei metaboliti viene eliminata attraverso le urine e solo una piccola quantità dalle feci. Molto tempo dopo la scomparsa dei loro effetti psicoattivi, i metaboliti polari sono trattenuti nei tessuti del corpo anche per una settimana. Infatti, l'assunzione di derivati di *Cannabis* ad intervalli inferiori ad una settimana provoca un accumulo dei metaboliti del  $\Delta^9$ -THC nei tessuti, compreso il cervello. Questo lungo periodo di ritenzione è dato dalla solubilità dei composti nei grassi, al forte legame che si instaura con le proteine e al loro riciclaggio attraverso il sistema enteroepatico, che ne ritarda notevolmente l'eliminazione. Quindi, per determinare un'eventuale assunzione di *Cannabis* i metodi analitici si basano principalmente sull'individuazione e la determinazione in matrici complesse dell'acido  $\Delta^9$ -THC<sup>7</sup>.

Il prodotto metabolico presente in maggior quantità nelle urine è la forma acida del  $\Delta^9$ -THC. Il  $\Delta^9$ -THC non è escreto come sostanza tale e gli altri metaboliti sono presenti in quantità molto basse.

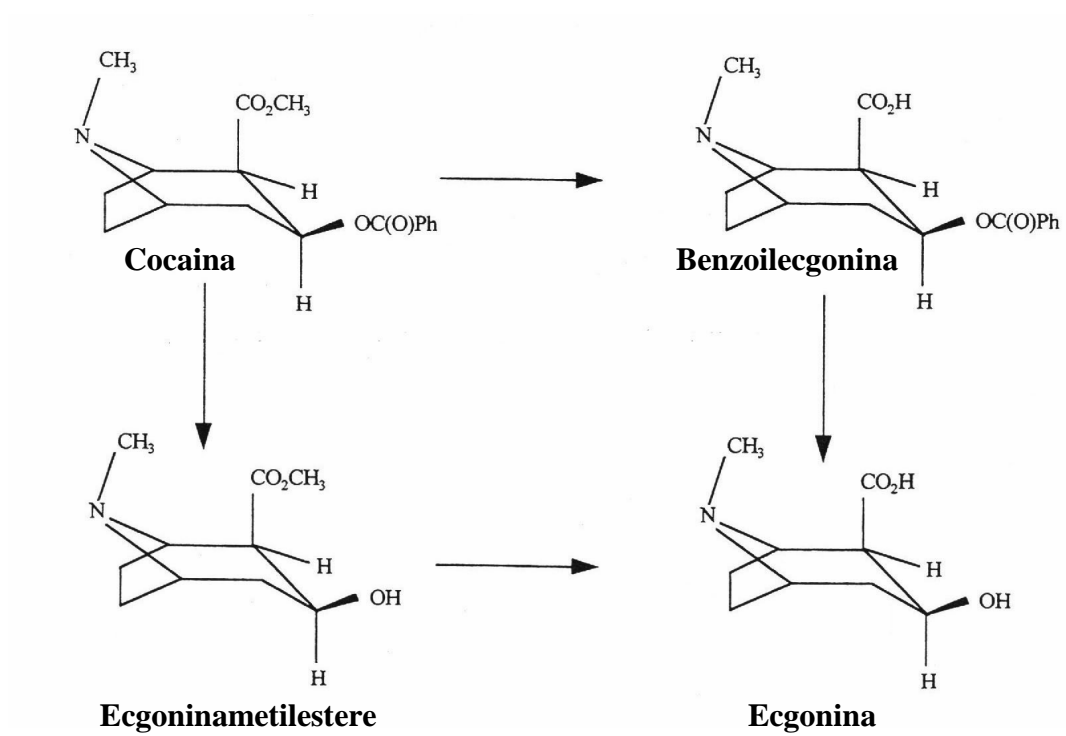
## *LA COCAINA*

La cocaina (COCA) viene rapidamente metabolizzata, così che solo poco meno del 10% è escreta tal quale nelle urine. Le colinesterasi ematica ed epatica idrolizzano la coca al più importante metabolita inattivo (Fig.4), l'ecgonina metilestere (EME), che costituisce il 32-49% del totale dei metaboliti urinari; l'altro metabolita principale è la benzoilecgonina (BE) la quale si ottiene principalmente per idrolisi non enzimatica e rappresenta il 29-45% dei metaboliti urinari totali. L'emivita di eliminazione dei suddetti metaboliti (rispettivamente 5-7 e 4-5h) supera quella della coca urinaria (1.5h). Di conseguenza i metodi di rilevazione della COCA si basano principalmente sull'individuazione e la determinazione dei suoi metaboliti piuttosto che della coca stessa<sup>8</sup>. La COCA può essere rilevata nelle urine fino a 8h dall'assunzione per via nasale di 1,5mg/kg, con un limite massimo di 12h. La BE, invece, può essere rilevata fino a 48-72h mediante tecniche cromatografiche e per 90-144h con tecniche radioimmunologiche. Il rapporto tra le concentrazioni urinarie di COCA e BE non permette di risalire alla concentrazione ematica di COCA, specialmente nei casi in cui sono state assunte dosi multiple. D'altra parte l'assenza di COCA a livello urinario o un rapporto BE\COCA maggiore di 100 indica un'assunzione a una distanza di tempo maggiore di 10h<sup>8</sup>.

L'accertamento dell'uso di droghe richiede l'individuazione e la quantificazione non solamente della droga "parente" ma anche dei suoi metaboliti, al fine di poter confermare con assoluta certezza l'effettiva assunzione diretta di droga, escludendo eventuali contaminazioni esterne dei campioni biologici sottoposti all'analisi.



**FIGURA 4. SCHEMA METABOLICO DELLA COCAINA**

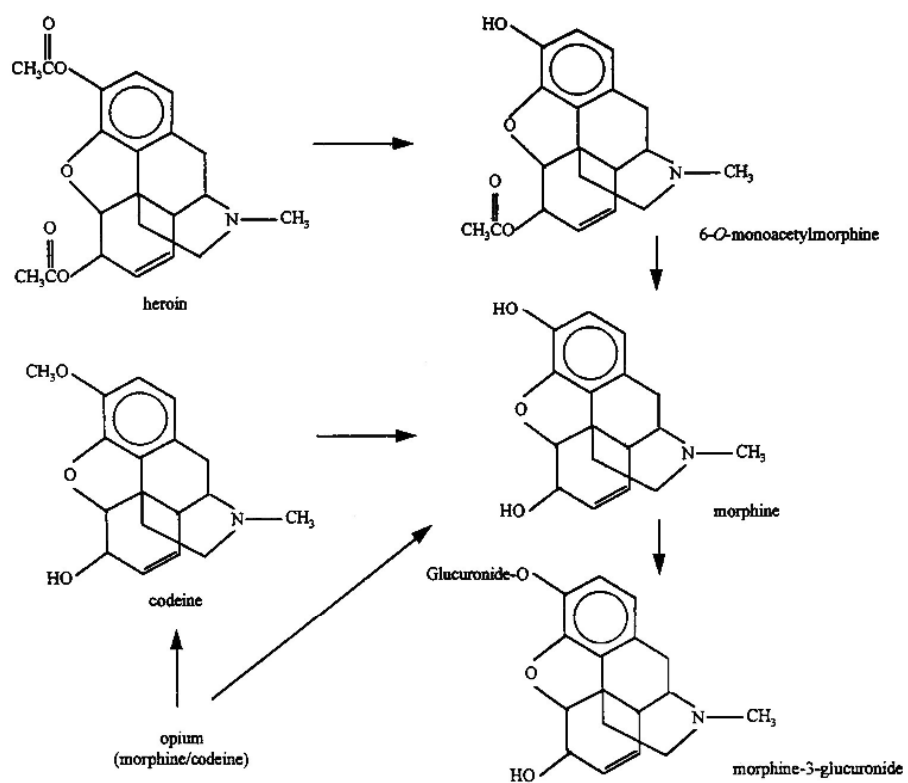


## L'EROINA

Una volta in circolo l'eroina viene prima trasformata a 6-monoacetilmorfina (6-MAM) per idrolisi del legame estereo in posizione 3, e poi a morfina (MOR) per idrolisi di un ulteriore legame estereo in posizione 6 (figura 1). MOR e 6-MAM sono i principi attivi responsabili dell'azione farmacologica dell'eroina stessa e risultano essere i principali metaboliti ritrovati nei liquidi biologici. In realtà, l'escrezione urinaria avviene per il 90% come morfina-glucuronato e solo nei primi minuti è possibile rilevare nel sangue il primo prodotto di idrolisi e cioè la 6-MAM<sup>9</sup>.

Un'ulteriore conferma dell'abuso di eroina può essere fornita dalla presenza di codeina (COD). Quest'ultima, infatti, viene estratta dall'oppio come impurezza assieme alla morfina e, una volta assorbita, viene metabolizzata ed escreta parzialmente nelle urine come sostanza immodificata<sup>8</sup>.

**FIGURA 5. SCHEMA METABOLICO DELL'EROINA**



### 1.3.2 METABOLISMO E MECCANISMO DI AZIONE DELL'ACIDO $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO

L'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico (GHB) è un componente del metabolismo dei mammiferi, nello specifico è presente nell'ipotalamo, nei reni, nel cuore, nei muscoli e nelle masse grasse<sup>28</sup>. Il GHB è un precursore e, allo stesso tempo, un prodotto di degradazione di un neurotrasmettitore con funzione inibitoria dell'acido  $\gamma$ -aminobutirrico, il GABA<sup>11</sup>. Infatti, il GABA è direttamente coinvolto nel metabolismo del GHB (Fig.6).

Una volta ingerito, il GHB, viene rapidamente assorbito nel tratto-gastro-intestinale e passa velocemente la barriera emato-encefalica<sup>12</sup>; trasformato rapidamente nel citosol cellulare dall'enzima GHB-deidrogenasi a semialdeide succinica, la quale, entra nel ciclo di Krebs e viene degradata a acqua e anidride carbonica<sup>13</sup>.

Il GHB presene nel metabolismo, viene prodotto dal GABA, il quale è prodotto dal glutammato mediante glutammato-decarbossilasi e viene trasformato per l'intervento del GABA-transaminasi in semialdeide succinica che diventa GHB per l'azione di una semialdeide succinica reductasi<sup>29</sup>. Interconversione di questa reazione determina la produzione del GABA dal GHB, infatti, esso è anche un metabolita del GABA. Di conseguenza, il GHB è considerato sia un prodotto di degradazione, sia un precursore del GABA. L'assunzione volontaria di GHB determina, quindi, anche aumenti dei livelli del GABA che, infatti, viene considerato un suo metabolita.

Inoltre, se non c'è assunzione volontaria della sostanza, il GHB è prodotto, oltre che dal GABA, da altri due prodrug<sup>29</sup>. Uno di questi è  $\gamma$ -butirrolattone (GBL) e l'altro è l'1,4-butanediolo (BD). Dal GBL si ottiene il GHB per azione delle gattionasi sieriche. Il BD, invece, viene trasformato nel fegato e nel cervello sotto l'azione degli enzimi alcoldeidrogenasi e aldeideidrogenasi. L'attivazione metabolica del DB implica dunque l'intervento dello stesso sistema enzimatico preposto da metabolismo dell'etanolo. Di conseguenza sia il GBL, sia il DB sono metaboliti del GHB. Ecco perché il GHB è difficile da dosare nei fluidi biologici. Inoltre, solo il 2-5% della droga parente compare nelle urine entro le 12 ore dall'ingestione e ha un emivita di 27 minuti<sup>30</sup>.

L'assunzione del GHB provoca, attraverso meccanismi in gran parte ancora sconosciuti, variazioni dei livelli di dopamina, serotonina e acetilcolina<sup>14</sup>. In generale, esplica numerose azioni, quali: regolazione del sonno, della temperatura, e del cibo, regola il metabolismo celebrale del glucosio, regola il flusso sanguigno, la memoria e il controllo emozionale<sup>18</sup>. Il

GHB è distribuito nel sistema nervoso centrale in modo eterogeneo con livelli altissimi nell'ippocampo, nell'ipotalamo e nella *substanza nigra*.

Il meccanismo di azione del GHB può essere diretto e indiretto: il primo vede legami tra la molecola del GHB e il suo recettori (recettore GHB) o legami tra GHB e i recettori GABA<sub>B</sub>; il secondo meccanismo di azione (indiretto) vede l'interconversione del GHB in GABA che successivamente agisce sui recettori GABA<sub>B</sub><sup>30</sup>. (Fig. 7)

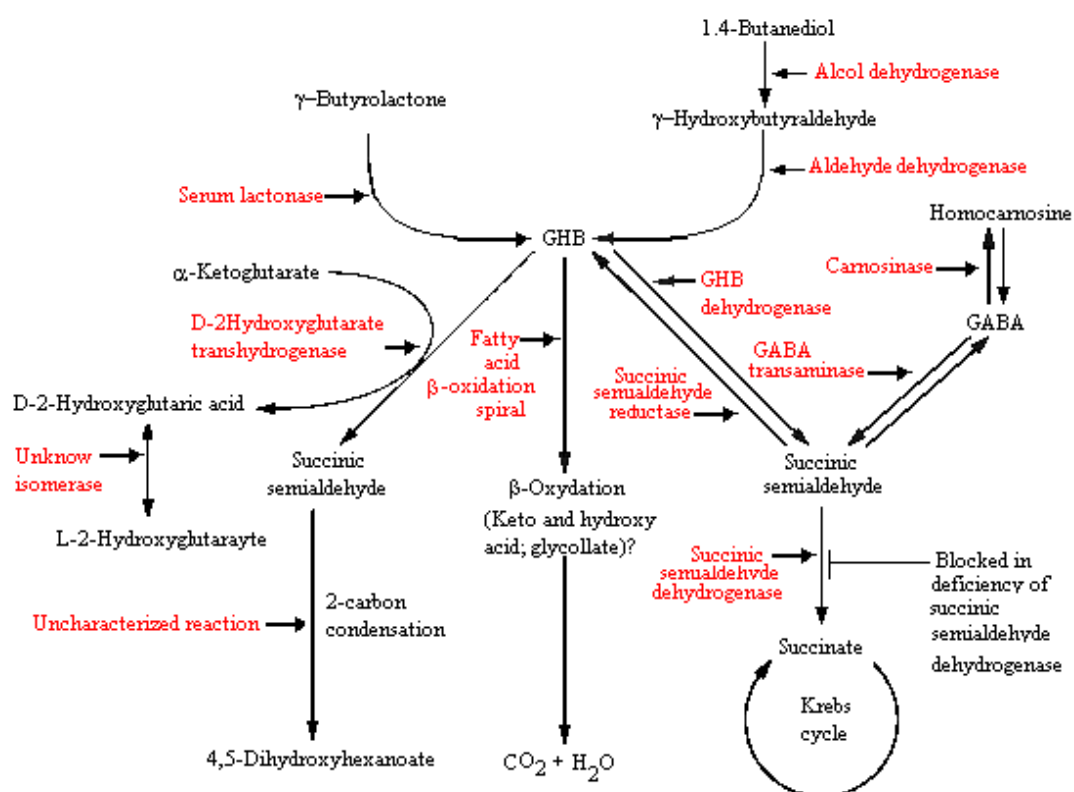
Il recettore GABA<sub>B</sub> è un recettore metabotropico, cioè accoppiato ad una proteina G ed è attivo sia a livello post-sinaptico, sia a livello presinaptico. Nel primo caso, l'attivazione recettoriale determina l'iperpolarizzazione della membrana per l'apertura dei canali del potassio e quindi inibizione; nel secondo caso, l'azione è sui canali del calcio voltaggio-dipendenti con l'effetto di diminuire la liberazione dei neurotrasmettitori glutammato e GABA, determinando i suoi effetti sull'organismo come, ad esempio, euforia<sup>31</sup>.

Il recettore GHB è stato caratterizzato recentemente e sua rilevanza sugli effetti comportamentali indotti dal GHB è molto controversa. Tuttavia, alcuni studi dimostrano che l'attivazione di questo recettore determina il rilascio di glutammato come agente stimolante; anche se non sembra che il recettore GHB spieghi le proprietà sedative che sono, invece, caratteristiche dell'azione sui recettori del GABA. Alcuni studi di letteratura mostrano che alte dosi di GHB provocherebbero sonnolenza e sedazione, mentre basse dosi, per l'alta affinità al recettore GHB, determina euforia e stato di ebbrezza. Questo spiegherebbe anche l'effetto "rimbalzo" sperimentato su individui che assumono il GHB come sonnifero, questi soggetti si svegliano molte ore dopo un sonno profondo indotto da GHB. Ciò è spiegato dal fatto che la concentrazione di GHB nell'organismo decresce in modo inversamente proporzionale al tempo; al tempo zero (assunzione del GHB come sonnifero) il soggetto si ritrova al di sopra della soglia di stimolazione del recettore GABA<sub>B</sub>, quindi il soggetto si ritrova in uno stato di sonnolenza e sedazione; al tempo x, il soggetto si trova al di sotto della soglia stimolante il recettore GABA<sub>B</sub>, sarà stimolato, quindi, solo il recettore GHB e l'individuo e l'individuo ritorna nel suo stato di coscienza<sup>31</sup>.

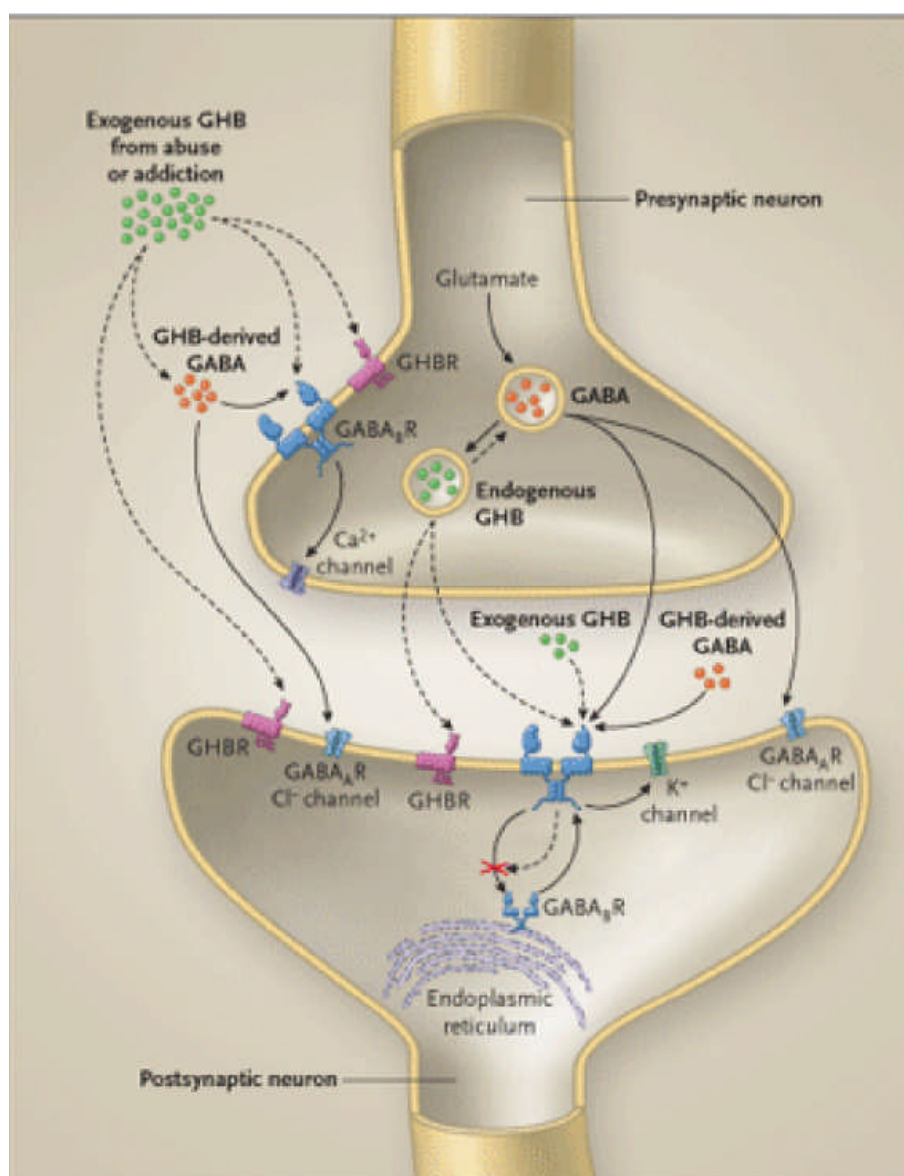
In altri studi di letteratura si considera il GHB più un neuromodulatore che un neurotrasmettitore, visto che il suo effetto primario viene dato dalla modulazione del sistema dopaminergico, correlata alla dose<sup>23</sup>. Infatti, il GHB a basse concentrazioni, meno di 1 mM, determinerebbe un aumento del rilascio di dopamina e questo spiegherebbe lo stato di euforia e iperdinamismo; invece a concentrazioni più alte si potrebbe avere un abbassamento della concentrazione di dopamina e questo comporterebbe sedazione e riduzione della funzione motoria. Il GHB interviene anche sul sistema colinergico e serotoninergico determinando

rispettivamente una diminuzione di acetilcolina nello striato e nell'ippocampo, (questo avrebbe a che fare con la perdita di coscienza e l'amnesia), e un aumento di serotonina, un neurotrasmettitore che regola il sonno, l'appetito, l'umore. Tutte queste sono ipotesi prodotte da studi compiuti sui ratti, i dati riferiti all'uomo sono ancora molto incerti<sup>23</sup>.

**FIGURA 6. METABOLISMO DELL' ACIDO  $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO**



**FIGURA 7. MECCANISMO DI AZIONE DELL'ACIDO  $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO**





## **2 LEGISLAZIONE**

### **2.1 LEGISLAZIONE IN AMBITO NAZIONALE**

Il D.P.R. n. 309/90 “Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza”, stabilisce quali sono le sostanze stupefacenti o psicotrope sottoposte alla vigilanza ed al controllo del Ministero della Salute. Le sostanze in questione sono state raggruppate due tabelle: tabella 1) tutte le sostanze definite stupefacenti e/o psicotrope e tabella 2) i medicinali e/o i preparati aventi come principi attivi i composti elencati nella tabella 1.

Le tabelle sono state sviluppate in base agli effetti che le droghe hanno sull'organismo e alle conseguenze che un soggetto provoca nei riguardi della collettività, qualora le assumesse.

Le sostanze che rientrano nella tabella 1 sono: il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo e i suoi analoghi strutturali di origine naturale, le sostanze ottenute per sintesi o semisintesi che siano ad essi riconducibili per struttura chimica o per effetto farmaco-tossicologico. L'oppio e i materiali da cui possono essere ottenute le sostanze oppiacee naturali, estraibili dal papavero sonnifero; gli alcaloidi ad azione narcotica-analgesica da esso estraibili, le sostanze ottenute per trasformazione chimica di quelle prima indicate; le sostanze ottenibili per sintesi che siano riconducibili, per struttura chimica o per effetti, a quelle oppiacee precedentemente indicate; eventuali intermedi per la loro sintesi. Le foglie di coca e gli alcaloidi ad azione eccitante sul sistema nervoso centrale da queste estraibili; le sostanze ad azione analoga ottenute per trasformazione chimica degli alcaloidi sopra indicati oppure per sintesi.

Infine, il GHB attualmente si trova nella tabella I e in tabella II sezione B, come farmaco soggetto a controllo<sup>4</sup>.

## **2.2 REGOLAMENTAZIONI INTERNAZIONALI PER L'ACIDO $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO**

L'Agenzia Americana del Controllo delle Sostanze (ACT) formalizza le liste delle sostanze stupefacenti in base agli studi scientifici, agli effetti farmacologici e alla regolamentazione presente per ciascuno stato americano.

Dal 1992 il Governo Americano ha messo al bando l'uso del GHB in ambiti sportivi e successivamente la sostanza è stata resa illegale e sottoposta a regolamentazione e ad indagini<sup>32</sup>, in seguito ai numerosi casi di violenze sessuali riscontrate nei college americani.

In Europa dall'anno 2000 la Commissione Europea ha ricevuto, dall'Osservatorio Europeo sulle Droghe e le Tossicodipendenze (OEDT), la relazione sulla valutazione dei rischi per quanto riguarda il GHB nell'ambito dell'azione comune sulle nuove droghe sintetiche del 16 giugno 1997. Tuttavia, non vige una regolamentazione unica e chiara per tutti gli stati dell'Unione Europea<sup>33</sup>.

## **2.3 ASPETTI FORENSI**

Indagini condotte con varie metodiche analitiche sono suscettibili di concrete applicazioni in campo civile e penale e vengono utilizzate per accertare l'uso di sostanze stupefacenti. Tali metodiche rappresentano un valido sistema per monitorare categorie a rischio, il cui lavoro implica elevata responsabilità nei confronti della collettività, come ad es. piloti o autisti di mezzi pubblici per dimostrare la responsabilità di individui colpevoli di aver causato gravi incidenti stradali, per cause civili relative alla custodia dei figli, alle adozioni, alle pratiche di separazione e/o divorzio ed anche per l'interpretazione nei casi di morte da acuta intossicazione dovuta a sostanze stupefacenti<sup>6,34</sup>. Inoltre, indagini tossicologiche sono necessarie per gli accertamenti di cui all'art. 89 (idoneità alla guida e revisione della patente) del D.P.R. 15 giugno 1959 n. 393 (testo unico delle norme sulla circolazione stradale) nonché da quanto previsto dall'art. 91 del D.P.R. 14 febbraio 1964 n. 237 e dal D.P.R. del 20 maggio 1964 n. 496 (sulle cause di non idoneità al servizio militare)

### **3 METODI DI ANALISI**

I metodi classici solitamente adoperati per verificare eventuali situazioni di abuso utilizzano le urine ed il sangue come liquidi biologici preferenziali su cui eseguire le ricerche sul soggetto vivente. Nel caso specifico dell'eroina e della cocaina e della cannabis, qualora sia sufficiente una analisi solamente qualitativa, si possono impiegare tests immunotossicologici quali: saggio radioimmunologico (RIA), saggio immunoenzimatico (EMIT), saggio di immunofluorescenza (FPIA). Oltre a questi tests diretti, in letteratura si ritrovano tecniche di cromatografia su strato sottile e cromatografia liquido-gas eseguite dopo estrazione solido-liquido (su colonnine) o liquido-liquido degli analiti dai fluidi biologici dei soggetti in esame<sup>6</sup>.

Ottimi risultati sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di tecniche di gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) grazie alla loro maggiore affidabilità e alla capacità di rilevare metaboliti particolarmente utili per la conferma dell'uso di droghe<sup>6</sup>. Anche l'analisi mediante HPLC è stata adoperata come tecnica per la rivelazione di droghe e sembra offrire sensibilità e riproducibilità paragonabili alla GC/MS senza tuttavia garantire una specificità sufficiente da poter essere usata in caso di accertamento di responsabilità di natura legale<sup>35</sup>.

#### **3.1 LE MATRICI COMPLESSE**

##### **3.1.2 ANALISI DEGLI STUPEFACENTI NELLE URINE**

La scelta di un opportuno biomarcatore, atto a rappresentare anche bassi livelli sostanza, si basa su un preliminare studio dei processi di assorbimento, distribuzione, trasformazione e di eliminazione dell'agente tossico stesso all'interno dell'organismo umano.

I meccanismi e le cinetiche di assorbimento, distribuzione ed eliminazione determinano le modalità con cui il campionamento deve essere effettuato o, in altri termini, consentono di stabilire quale matrice biologica analizzare (ad esempio sangue o urine) e il periodo di raccolta o di prelievo del campione biologico. Infatti, nel caso di molte sostanze stupefacenti il prelievo di campione deve essere effettuato nelle 3 ore successive all'assunzione della sostanza. Il metabolismo della sostanza esogena rende conto, invece, delle percentuali di biotrasformazione della sostanza assorbita nei suoi metaboliti e della maggiore o minore stabilità degli stessi nei fluidi biologici in esame.

Un biomarcatore ‘sensibile’, rappresentativo cioè anche di bassi livelli di esposizione, deve mostrare requisiti di abbondanza, stabilità e, ovviamente, correlazione con le concentrazioni ambientali dell’agente inquinante, anche se presente in minime quantità. Il biomarcatore risulta invece ‘specifico’ nel momento in cui la sua presenza all’interno dell’organismo può derivare esclusivamente dall’avvenuto assorbimento di una particolare sostanza eventualmente metabolizzata e non da interferenze di natura alimentare o da vie metaboliche parallele, relative alla biotrasformazione di altre sostanze esogene o endogene.

Il principale metabolita inattivo della cocaina è l’ecgoninametilestere (EME), che rispetta i requisiti di abbondanza di un biomarcatore; l’altro metabolita è la benzoilecgonina (BE) il quale risulta essere quello più stabile in matrice urinaria. L’emivita di eliminazione dei suddetti metaboliti supera quella della cocaina urinaria (1.5h). Di conseguenza i metodi di rilevazione della cocaina si basano principalmente sull’individuazione e la determinazione dei suoi metaboliti piuttosto che della coca stessa<sup>6</sup>. Tuttavia, l’analisi delle urine implica anche il dosaggio della cocaina tal quale, in quanto il rapporto BE\COCA se maggiore di 100 è indice di un’assunzione a una distanza di tempo maggiore di 10h.

L’accertamento dell’abuso di eroina viene effettuato dosando, in generale, la 6-monoacetilmorfina, la morfina e la codeina.

Per valutare se un soggetto ha assunto *cannabis* e/o i suoi analoghi si dosa il metabolita presente in maggiori quantità: l’acido  $\Delta^9$ -idrocannabinolo<sup>36</sup>.

Maggiori difficoltà si riscontrano per l’identificazione dell’acido  $\gamma$ -idrossibutirrico, in quanto il suo metabolismo e meccanismo di azione coinvolgono altre molecole endogene. Tuttavia, il dosaggio del GHB nelle urine di un soggetto può essere effettuato qualora il prelievo avvenga entro poche ore dall’assunzione, dosando la sostanza tal quale<sup>37</sup>.

Da quanto detto, l’analisi delle urine di molte sostanze stupefacenti presenta il limite di non poter dimostrare la presenza di droga se la distanza di tempo tra l’assunzione e l’accertamento diagnostico risulta maggiore di 2-3 giorni; ciò dipende dalla cinetica di eliminazione che può essere rappresentata da una curva caratterizzata inizialmente da una rapida salita e successivamente da una discesa altrettanto rapida<sup>38</sup>. Di conseguenza è difficile stabilire se il campione raccolto ricada sul tratto ascendente o discendente della curva: ad esempio un basso livello di droga nelle urine potrebbe essere correlato con l’assunzione recente di una piccola quantità individuale o, al contrario, di una quantità maggiore assunta,

però, giorni addietro. Ancora meno utile, da questo punto di vista, è l'analisi del sangue che riflette solo assunzioni risalenti a poche ore precedenti il prelievo.

### 3.1.3 ANALISI DEL CAPELLO

Il notevole sviluppo delle tecniche analitiche in tossicologia forense ha da tempo permesso l'utilizzo di matrici alternative (capelli, peli, saliva, unghie) a quelle tradizionalmente impiegate (sangue e urine). Un vantaggio consiste nella maggiore facilità di prelievo nonché l'uso di tecniche di prelievo non invasive<sup>39</sup>. Inoltre, numerose sostanze stupefacenti permangono stabilmente nella matrice cheratinica senza essere ulteriormente metabolizzate ed eliminate e ciò permette la loro ricerca cronologicamente retroattiva, anche a scopi forensi<sup>6</sup>.

I capelli, infatti, possono essere raccolti, sotto accurato controllo, senza disagi, il che apre la possibilità ad applicazioni anche in ambiti diversi da quello di natura strettamente legale, quale, ad esempio, l'ambito lavorativo, al fine di testare il personale circa l'eventuale uso di droghe. Inoltre, nel caso in cui, per diversi motivi, esista l'impossibilità di campionare i capelli del soggetto assuntore, come matrice alternativa al capello si possono prelevare i peli ascellari, pubici o i peli presenti sul torace del soggetto.

Il processo di incorporazione delle sostanze di abuso nella matrice cheratinica rende questo metodo analitico adeguato anche nei casi di uso saltuario o occasionale di droghe<sup>6</sup>. Infatti "l'analisi segmentale" del capello, relazionata alle fasi di crescita del capello stesso (ogni segmento di capello corrisponde ad un periodo di tempo definito), comporta la possibilità di risalire al periodo di assunzione dello stupefacente; in tal modo è possibile seguire, ad esempio, la storia dell'abuso di soggetti in programma di riabilitazione. Mediante i peli, invece, si può determinare solo la quantità di sostanza assunta in quanto la crescita e caduta dei peli avviene in tempi più lunghi rispetto al capello.

L'analisi condotta sui capelli presenta, d'altra parte, un indubbio vantaggio rispetto alle tecniche classiche di determinazione degli stupefacenti nei fluidi biologici in quanto risulta meno suscettibile alle cosiddette "strategie evasive", cioè all'adulterazione o alla sostituzione del campione<sup>38</sup>.

Le analisi concomitanti dei capelli e delle urine risultano, quindi, complementari piuttosto che contrastanti, l'una fornisce informazioni a lungo termine, l'altra a breve termine<sup>39</sup>.

Tuttavia, l'analisi delle urine potrebbe dar luogo a falsi negativi semplicemente con l'astensione pochi giorni prima dell'analisi o con l'immissione di un'eccessiva quantità d'acqua che favorisce l'eliminazione urinaria<sup>40</sup>; mentre nessuna di queste azioni evasive potrebbe confondere l'analisi condotta sui capelli.

### 3.1.3 MECCANISMO DI INCORPORAZIONE ED ESTRAZIONE DELLE

#### “DROGHE DAL CAPELLO”

La delucidazione del complesso fenomeno dell'incorporazione delle droghe nei capelli prevede una conoscenza, seppur sommaria, della biologia del pelo.

Il pelo è costituito da una parte visibile, il fusto, e dalla radice. Quest'ultima è inserita in un'invaginazione dell'epidermide, il follicolo pilifero, che nella sua parte più profonda si rigonfia formando il bulbo pilifero, il cui diametro varia con la sede anatomica. L'epitelio che riveste la papilla connettivale del bulbo pilifero è formato da cellule in attiva proliferazione che danno origine al pelo. Il capello è una complessa struttura costituita da acqua, composti minerali, proteine fibrose ( $\alpha$  e  $\beta$  cheratina), lipidi e melanina (polimero complesso derivato dalla tirosina)<sup>41</sup>. Le droghe possono legarsi ai gruppi funzionali di questi componenti attraverso deboli interazioni elettrostatiche, legami idrofobici e ionici, specifici o aspecifici.

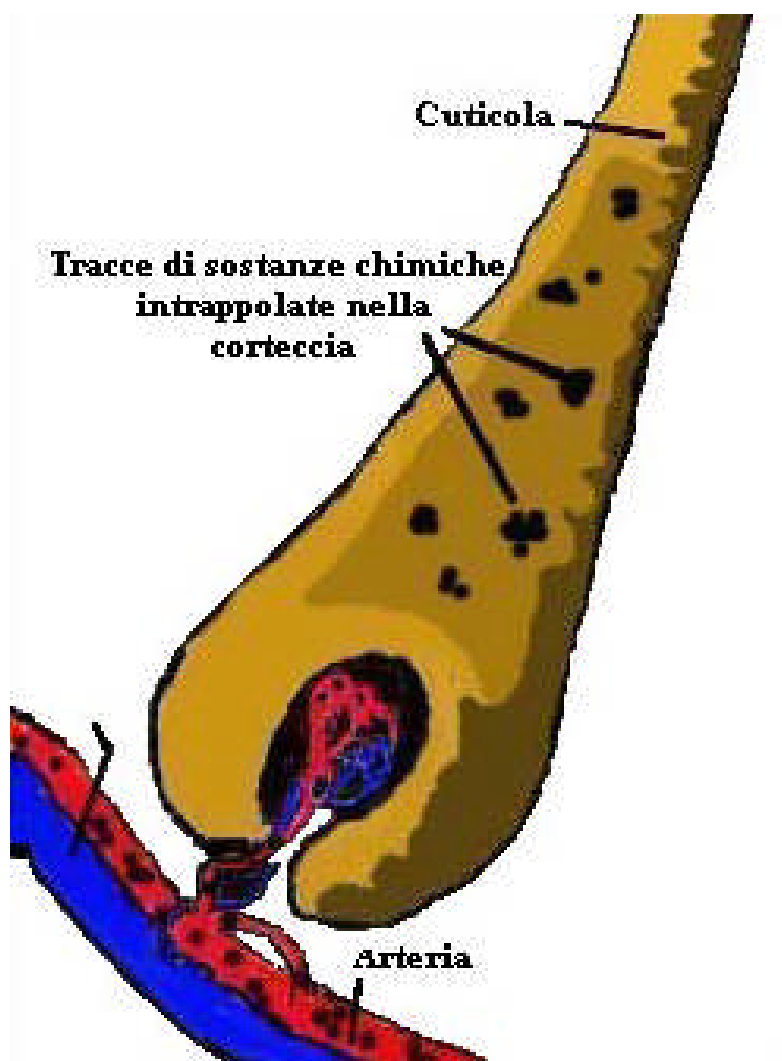
Il meccanismo di incorporazione è stato studiato e variamente interpretato: il modello più semplice prevede la diffusione attiva o/e passiva delle molecole dal sangue alle cellule in rapido accrescimento del bulbo pilifero e il loro definitivo “intrappolamento”<sup>6</sup>. Tale modello, però, risulta piuttosto semplicistico ed è, inoltre, contraddetto dall'evidenza che non c'è nessuna corrispondenza tra il rapporto “droga parente”/metaboliti nei capelli e nel sangue. Teorie alternative e/o complementari tengono conto della diffusione delle droghe attraverso il sudore e il sebo durante la formazione del capello nonché della esposizione a fonti esterne di contaminazione dopo la formazione del capello stesso. Infatti, quando la droga è ingerita, i metaboliti sono escreti anche attraverso il sudore e il sebo che, bagnando il fusto del capello, favoriscono l'incorporazione della droga probabilmente attraverso un meccanismo di scambio ionico<sup>42</sup>. Secondariamente anche la droga presente nell'ambiente può venire incorporata allo stesso modo (Fig.8).

Infatti, l'accertamento dell'uso di droghe richiede l'individuazione e la quantificazione non solamente della droga “parente” ma anche dei suoi metaboliti, al fine di poter confermare

con assoluta certezza l'effettiva assunzione diretta di droga, escludendo eventuali contaminazioni esterne dei campioni biologici sottoposti all'analisi.

Diversi parametri influenzano l'attraversamento delle membrane biologiche da parte delle droghe e quindi il loro assorbimento nel follicolo: forma e peso molecolare delle molecole, natura delle biomembrane, flusso sanguigno, legame alle proteine plasmatiche, liposolubilità della droga, rapporto tra la forma ionizzata e non ionizzata della droga, gradiente di concentrazione, etc. Tra tutti questi, la liposolubilità costituisce il fattore determinante, come si evince dal fatto che nei capelli la concentrazione di cocaina predomina su quella della BE, la 6-MAM predomina sulla morfina, l'acido tetraidrocannabinolo (THCOOH) predomina sul  $\Delta^9$ -THC<sup>43</sup> e dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico predomina sul GABA e sul GBL<sup>44</sup>.

**FIGURA 8.** INCORPORAZIONE DELLE “DROGHE” NELLE MATRICI CHERATINICHE.





### 3.2 CUT OFF ANALITICO

Il principale scopo dell'analisi quantitativa dei capelli e nelle urine è quello di poter qualificare il campione come positivo o negativo rispetto ad un prefissato cut-off. Quest'ultimo può essere definito come il limite inferiore al di sotto del quale non è possibile avere l'assoluta certezza dell'avvenuta assunzione. Pertanto il valore di cut-off permette di correlare inequivocabilmente la positività rilevata con l'effettiva assunzione.

Il valore di cut-off analitico dipende dalla tecnica, dalla strumentazione utilizzata, dal metodo analitico e dalle sue caratteristiche di accuratezza, precisione e sensibilità. L'introduzione dei valori di cut-off rende più efficace l'interpretazione dei dati analitici e consente di non incorrere in eventuali falsi positivi. La presenza di droga nei capelli, infatti, può derivare tanto dall'incorporazione durante la crescita dei capelli dal circolo sanguigno, tanto dall'incorporazione dopo la crescita dei capelli attraverso il sudore o per contaminazione esterna. Il sudore, ad esempio, che è un veicolo con cui le droghe vengono incorporate nei capelli, potrebbe essere potenzialmente contaminato da fonti esterne di droga, generando falsi positivi, non legati ad assunzione individuale volontaria. Tuttavia nell'accertamento dell'uso di droga è necessario escludere il fattore contaminazione; quest'ultima non può essere totalmente rimossa all'interno di qualsiasi laboratorio di tossicologia che effettui analisi di routine, pertanto, l'interpretazione dei risultati potrebbe diventare problematica. Tale difficoltà può essere superata tenendo in debita considerazione la concomitante presenza dei metaboliti - come accennato precedentemente - e introducendo appropriati valori di cut-off.

I valori di cut-off vengono fissati analizzando capelli e urine denominati "bianchi"; provenienti da soggetti non utilizzatori. Attraverso studi statistici interlaboratorio sono stati stabiliti alcuni valori di cut-off, riportati nella tabella 1.

**TABELLA 1.** CUT-OFF ANALITICI DELLE SOSTANZE STUPEFACENTI DI INTERESSE

| SOSTANZA                         | CUT-OFF URINE<br>(ng/ml) | CUT-OFF CAPELLI<br>(ng/mg) |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo | 15                       | 0,5                        |
| Cocaina e metaboliti             | 150                      |                            |
| Eroina e metaboliti              | 300                      |                            |
| Acido $\gamma$ -idrossibutirrico | 1000                     | ND                         |

In ogni caso, il dibattito circa i valori di cut-off analitici cui fare riferimento risulta ancora aperto e in piena evoluzione<sup>25,34</sup>.

## SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA

Il presente lavoro di ricerca è stato incentrato sullo sviluppo di metodiche analitiche volte alla quantificazione delle sostanze stupefacenti in urina e in matrici pilifere di soggetti dediti all'uso di droghe. In particolare, sono state considerate tra le sostanze di origine naturale la cocaina (COC), la benzoilecgonina (BE), l'ecgoninametilestere (EME), la morfina (MOR), la codeina (COD) e l'acido  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THCOOH) e tra le nuove droghe di è stato studiato l'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico (GHB).

Il lavoro si è avvalso di tecniche analitiche ifenate di Gas Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa a singolo stadio e tandem, GC/MS e GC/MS-MS, e Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni accoppiata alla Spettrometria di Massa a singolo stadio e tandem, LC-MS e LC-MS/MS.

Il lavoro è stato suddiviso in tre fasi, sviluppate nel corso di tre anni.

Nel corso del primo anno si è proceduto alla caratterizzazione degli analiti mediante tecniche di GC/MS e LC/MS, utilizzando strumenti con analizzatore a trappola ionica. In particolare, per l'analisi gas cromatografica è stato necessario derivatizzare gli analiti, scegliendo il miglior agente derivatizzante ed ottimizzando le condizioni di reazione, al fine di ottenere una reazione riproducibile e dalla resa quantitativa.

La caratterizzazione completa degli analiti ha permesso di ricavare le seguenti informazioni:

- a. tempi di ritenzione relativi all'analisi GC;
- b. condizioni di eluizione, rappresentate dalle temperature di iniezione e dal gradiente di temperatura per l'analisi GC;
- c. interpretazione degli spettri di massa dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico, ottenuti mediante tecniche di ionizzazione ad electrospray (ESI) e di ionizzazione elettronica (EI, Electronic Ionization) per l'analisi GC del GHB e degli altri analiti;
- d. utilizzo dell'MS-MS e SIM come tecniche di acquisizione per l'EI, al fine di poter scegliere il metodo che garantisca maggiore specificità all'analisi.

Nel corso del secondo anno, in particolare, è stata affrontata la problematica relativa all'utilizzo di un opportuno agente derivatizzante. Si è proceduto alla messa a punto dei parametri di tempo e temperatura adoperando anidride eptafluorobutirrica (HFBA) e N,O-bis(trimetilsilil) trifluoro-acetamide (BSTFA). Allo scopo di derivatizzare simultaneamente gli analiti l'agente più idoneo è risultato essere il BSTFA.

È stata successivamente affrontata la problematica riguardante l'estrazione simultanea degli analiti dalla matrice biologica e dalla matrice pilifera, paragonando diverse tecniche di estrazione alla luce delle percentuali di recupero e della necessità di contenere i tempi dell'analisi. A tal scopo sono stati preparati ed analizzati campioni di urina e di capelli (di soggetti non assuntori di droghe) addizionati degli analiti e dei relativi standard interni scelti. Tali campioni sono stati estratti mediante cromatografia liquido/liquido (L/L) ed estrazione in fase solida (Solid Phase Extraction, SPE) utilizzando cartucce a scambio ionico, e analizzati mediante GC/MS-MS e GC/MS-SIM. Per entrambe le tecniche estrattive le analisi degli estratti hanno evidenziato che la simultaneità non viene mantenuta per la maggior parte degli analiti, di conseguenza sono state ottimizzate differenti tecniche di purificazione per le diverse sostanze; ciò ha permesso di contenere i tempi e i costi della purificazione.

Nel corso del terzo si è proceduto, quindi, alla costruzione di rette di calibrazione per tutte le sostanze in GC/MS, valutando la linearità della risposta, il limite di rivelabilità ottenibile, i tempi ed i costi complessivi dell'analisi, al fine di scegliere la migliore tecnica analitica.

I metodi analitici sviluppati sono stati applicati alla quantificazione dei livelli di sostanze di abuso in campioni di urina e capelli di soggetti dediti.

## 4. PROCEDURE, MATERIALI E METODI

### *PRESUPPOSTI TEORICI*

#### 4.1 PARAMETRI DI VALIDAZIONE DEL DATO ANALITICO

La “validazione” di un metodo analitico consiste in una raccolta di dati sperimentali allo scopo di dimostrare l’adeguatezza e l’attendibilità della procedura analitica adoperata per identificare e/o quantificare una sostanza di interesse.

In altre parole, affinché i risultati forniti dall’analisi di un campione incognito mediante l’applicazione di una specifica procedura analitica siano accreditati e abbiano validità generale, indipendentemente dal laboratorio di analisi, la procedura analitica adoperata deve soddisfare specifici requisiti (parametri di validazione), i quali attestano, appunto, la “bontà” dell’analisi.

Il protocollo di validazione prevede, quindi, l’effettuazione di una serie di esperimenti tesi a valutare sensibilità, specificità, precisione e accuratezza della tecnica analitica in esame, verificando in tal modo il rispetto dei requisiti richiesti.

### *DEFINIZIONI*

- *Riproducibilità e ripetibilità*: un metodo è considerato riproducibile se effettuando analisi più volte con la stessa tecnica e le medesime condizioni operative, si ottiene un esito identico (nell’ambito dell’incertezza di misura). Per ripetibile si intende un’analisi che, pur eseguita con strumentazioni analoghe, analisti e laboratori differenti fornisce un risultato finale, comunque, equivalente.

- *Selettività o Specificità*: Capacità del metodo bioanalitico di misurare e discriminare gli analiti da sostanze eventualmente presenti nella matrice complessa, quali metaboliti, impurezze o componenti generiche della matrice stessa.

- *Intra- e Inter-Assay, Intra- e Inter-Day*: il termine *Intra-Assay* significa letteralmente “nell’ambito dello stesso saggio (o analisi)”; dove per “saggio” si intende uno stesso campione oppure un set di campioni preparati da un unico *batch* iniziale (come ad esempio i campioni adoperati per costruire una retta di taratura). Quindi, valutare il valore di un parametro “intra-assay” significa analizzare lo stesso campione più volte (nello stesso giorno o in giorni diversi)

e fornisce un'indicazione circa la riproducibilità strumentale e/o la riproducibilità della procedura analitica complessiva (estrazione dalla matrice complessa e rivelazione).

Il termine *Inter-Assay* (“fra più saggi”) significa paragonare analisi relative a due o più campioni analoghi, preparati, cioè, allo stesso modo ma in momenti differenti. Un parametro inter-assay, quindi, è correlato alla riproducibilità della preparazione (trattamento) e dell'analisi del campione in esame, per evidenziare sia errori soggettivi (dovuti a negligenza operativa o a particolarità individuali dell'analista) che errori casuali (batch iniziali differenti ecc.).

Per *Intra-* e *Inter-Day* si intendono analisi condotte in un unico giorno o in giorni differenti, fornendo indicazioni circa la stabilità strumentale, cioè l'eventuale variabilità della risposta strumentale a seguito delle condizioni operative.

#### 4.1.1 LIMITI DI SENSIBILITÀ E DI QUANTIFICAZIONE

Il limite di sensibilità (LOD) di un metodo indica la quantità minima di analita che si riesce a rilevare con la metodica scelta; il limite di quantificazione (LLOQ) è la minima concentrazione di analita quantificabile.

Il limite di sensibilità e il limite di quantificazione sono calcolati attraverso analisi ripetute di campioni costituiti dalla matrice del campione reale addizionata unicamente dello standard interno. L'LOD e l'LLOQ possono essere definiti rispettivamente come tre e dieci volte (oppure tre e cinque volte) la deviazione standard relativa al picco cromatografico rilevato al tempo di ritenzione dell'analita di interesse.

#### 4.1.2 PRECISIONE E ACCURATEZZA

Il parametro “precisione” è connesso al concetto di riproducibilità analitica. La precisione indica la concordanza tra risultati di misure relative allo stesso campione (intra-assay) o a campioni analoghi (inter-assay) ottenute mediante analisi condotte lo stesso giorno (intra-day) o in giorni diversi (inter-day). Il parametro si valuta attraverso la determinazione della deviazione standard e del coefficiente di variazione (CV), il quale è un indice percentuale che correla l'errore della misura al valore medio di concentrazione ottenuto durante le analisi.

L'accuratezza, invece, è un indice di quanto il risultato ottenuto sia prossimo al valore vero (teorico). L'accuratezza si determina analizzando campioni con quantità note di analita; il

valore di concentrazione ottenuto dall'analisi si confronta poi con quello vero (nominale), valutando percentualmente di quanto si discosta.

Entrambi i parametri dovrebbero essere misurati utilizzando un minimo di cinque determinazioni per concentrazione. E' raccomandato un minimo di tre livelli di concentrazione compresi nel range dei valori di concentrazione attesi<sup>45</sup>.

## **4.2 ESTRAZIONE DEGLI ANALITI DALLA MATRICE COMPLESSA**

### **4.2.1 ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO**

La tecnica di estrazione liquido-liquido sfrutta il processo di ripartizione in base al quale un dato composto si distribuisce in funzione della propria solubilità tra due fasi non miscibili tra loro<sup>46</sup>. Il coefficiente di ripartizione  $K$ , rappresentato dal rapporto tra la concentrazione dell'analita nella fase organica e in quella acquosa, può essere ottimizzato agendo su variabili del sistema, quali: solvente, pH, forza ionica e temperatura.

L'urina è una matrice acquosa, pertanto gli analiti vengono estratti mediante l'utilizzo di adeguati solventi organici, tenendo presente la "regola" generale secondo cui "il simile scioglie il simile", per cui sostanze apolari si estraggono meglio adoperando solventi apolari e viceversa.

Il pH del campione può essere un valore critico per ottenere elevati recuperi di estrazione e deve di solito essere regolato in modo da favorire le forme indissociate dell'analita, maggiormente ripartibili nel solvente organico; l'aumento della forza ionica di una soluzione acquosa mediante l'aggiunta di tamponi salini sposta l'equilibrio di ripartizione delle sostanze lipofile a favore della fase organica.

Sia l'efficienza sia la selettività di un'estrazione liquido-liquido migliorano attraverso estrazioni multiple con piccoli volumi di solvente di estrazione, in quanto l'utilizzo di due o più aliquote di solvente corrisponde a due o più procedimenti di estrazione e, quindi, si dimostra più efficace nel recupero, rispetto ad una singola estrazione con un'aliquota di pari volume totale.

#### 4.2.2 ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA

La tecnica di estrazione in fase solida viene adoperata per purificare, isolare e concentrare sostanze presenti in matrici complesse e si basa sulle interazioni tra gli analiti in esame e i gruppi funzionali della fase solida di cui è composta la cartuccia di estrazione<sup>47</sup>.

La procedura di estrazione consiste nel far adsorbire in testa alla cartuccia (precedentemente condizionata) la soluzione contenente gli analiti da separare; quindi, la cartuccia viene 'lavata' facendo fluire un solvente in grado di sciogliere ed allontanare tutte le sostanze non trattenute dalla fase stazionaria della cartuccia. Successivamente gli analiti vengono eluiti e raccolti, adoperando un solvente verso cui presentano un'elevata affinità.

La fase stazionaria della cartuccia di estrazione è caratterizzata non solo dalla natura chimica dei gruppi funzionali, ma anche dalle dimensioni delle particelle che la compongono e dall'impaccamento della cartuccia stessa: minori sono le dimensioni delle particelle, maggiore è la superficie adsorbente in grado di interagire con le sostanze in analisi. L'impaccamento, invece, rende conto della maggiore o minore capacità di separare sostanze di dimensioni variabili. La scelta della composizione chimica e fisica della fase stazionaria è cruciale per l'ottimizzazione della procedura di estrazione: la fase stazionaria deve essere in grado di trattenere selettivamente gli analiti di interesse, per poi rilasciarli durante la fase di eluizione

#### 4.3 GAS CROMATOGRAFIA

La cromatografia in fase gassosa (GC) è una tecnica ad alto potere risolutivo che consente la separazione delle sostanze in base a proprietà chimico-fisiche quali temperatura di ebollizione, polarità e dimensioni delle molecole<sup>47</sup>.

L'analisi gas cromatografica è condotta utilizzando una fase stazionaria solida o liquida (adsorbita su un supporto siliceo) e un gas inerte (generalmente elio o azoto) quale gas di trasporto. In presenza di una miscela di sostanze, variando la temperatura, ogni componente si ripartisce in maniera differente tra la fase stazionaria e la fase vapore e viene quindi eluito in tempi diversi.

L'introduzione della miscela in una colonna cromatografica richiede necessariamente la vaporizzazione del campione in esame: nel caso in cui tali sostanze non siano sufficientemente volatili, risulta necessario, prima dell'introduzione del campione nel gas cromatografo, procedere ad una reazione di derivatizzazione tale da modificare la polarità delle molecole, abbassandone il punto di ebollizione.



Si possono utilizzare due diverse tecniche di iniezione: “a freddo” (*on-column*) e “a caldo” (*split* o *splitless*).

Il sistema *on-column* prevede l'introduzione del campione direttamente nella colonna capillare, ad una temperatura pari alla temperatura iniziale del forno del gas cromatografo (solitamente di poco superiore alla temperatura di ebollizione del solvente adoperato). La seconda tecnica di introduzione prevede che il campione sia iniettato, attraverso un setto poroso, all'interno di un “liner” di vetro posto ad una temperatura solitamente compresa fra 220 e 260 °C, necessaria per la vaporizzazione del campione stesso.

L'iniezione *on-column* “a freddo” presenta alcuni vantaggi rispetto alla tradizionale tecnica di vaporizzazione a caldo, in quanto evita la degradazione termica dei componenti e, consentendo l'introduzione del campione direttamente in colonna, previene un possibile assorbimento delle molecole all'interno del liner, fornendo risultati quantitativi maggiormente riproducibili. D'altro canto l'iniezione *on-column* comporta un consumo maggiore della colonna capillare stessa e quindi la necessità di lavorare con campioni sottoposti a fasi di purificazione più accurate.

La scelta quindi della tecnica di iniezione da adoperare nell'analisi di un campione risulta critica al fine di conseguire risultati ottimali in termini di sensibilità, riproducibilità, facilità di esecuzione e costi analitici.

#### 4.3.1 RIVELAZIONE DEGLI ANALITI

##### 4.3.1.1 SPETTROMETRIA DI MASSA

L'analisi mediante tecniche di Spettrometria di Massa consente di misurare il rapporto massa su carica ( $m/z$ ) dell'analita e, quindi, di ricavare informazioni riguardanti la composizione elementare e di determinare la struttura della sostanza in esame o procedere ad un'accurata analisi quantitativa. È questa una tecnica sensibile, specifica e di elevata riproducibilità. Inoltre, messo a punto il metodo analitico, la procedura può essere applicata nelle analisi di routine.

La Spettrometria di Massa si basa sulla ionizzazione e frammentazione delle molecole e sulla separazione degli ioni generati in fase gassosa mediante un opportuno analizzatore di massa. Un requisito necessario, quindi, per il funzionamento di uno spettrometro di massa è dato dalla presenza di ioni in fase gassosa della sostanza da esaminare.

Uno spettrometro di massa è uno strumento che lavora sotto vuoto spinto e si compone di un sistema di introduzione, una sorgente di ioni, un analizzatore di ioni e un rivelatore di ioni, collegato ad un sistema di elaborazione dati. Il sistema di introduzione del campione consente il passaggio dell'analita dalle condizioni di pressione atmosferica alle condizioni di vuoto di funzionamento dello spettrometro di massa senza perturbazione dello stesso. L'introduzione può avvenire, per introduzione e/o infusione diretta o collegando lo spettrometro di massa ad un sistema cromatografico (GC oppure HPLC). Nella sorgente ionica l'analita viene ionizzato, utilizzando tecniche diverse, tra cui: Ionizzazione Elettronica (EI, Electronic Ionization), Ionizzazione Chimica (CI, Chemical Ionization), Ionizzazione Electrospray (ESI, Electrospray Ionization), Ionizzazione Laser Assistita da Matrice (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), Bombardamento con Atomi Veloci (FAB, Fast Atom Bombardment). Nella fase successiva, l'analizzatore, ad esempio il quadrupolo e la trappola ionica, separa gli ioni prodotti in sorgente in base al rapporto  $m/z$ . Gli ioni giungono, quindi, ad un rivelatore dove generano un segnale elettrico proporzionale al numero di ioni prodotti in sorgente. Infine, il sistema di elaborazione dei dati registra i segnali elettrici e li converte in uno spettro di massa<sup>49</sup>.

#### 4.3.1.2 IONIZZAZIONE ELETTRONICA ED ELECTROSPRAY

La tecnica di ionizzazione più utilizzata per molecole che sono facilmente vaporizzabili e sono termostabili è la Ionizzazione Elettronica (EI).

Nella Ionizzazione Elettronica, una piccolissima quantità di sostanza portata allo stato vapore e introdotta nella sorgente di ioni, generalmente ad una pressione di  $10^{-6}$  mmHg, interagisce con un fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno o di renio riscaldato ed aventi un'energia di 70 eV (caso più frequente). Nell'urto gli elettroni cedono energia alle molecole di analita, che si ionizzano perdendo un elettrone dall'orbitale molecolare più esterno, con formazione di ioni positivi radicalici. Tali ioni, avendo un contenuto di energia interna molto alto, danno luogo ad una estensiva frammentazione, in funzione della natura chimica dell'analita stesso. Da questa frammentazione si generano ioni positivi cationici e/o radicali cationici, che, una volta separati e raccolti, generano uno spettro di massa che è caratteristico dell'analita come un'impronta digitale.

La Ionizzazione Elettronica è una tecnica di ionizzazione hard, che in alcuni casi può portare ad una estesa frammentazione lasciando poco o per niente rappresentato lo ione molecolare nello spettro di massa. Ovviamente in assenza del picco ionico molecolare nello spettro di massa il peso molecolare, che è un elemento distintivo per l'identificazione di una sostanza e che, comunque, è misurabile soltanto mediante tecniche di spettrometria di massa, può risultare difficilmente determinabile.

La Ionizzazione Electrospray (ESI)<sup>50</sup>, a differenza della precedente, è una tecnica di ionizzazione particolarmente compatibile con separazioni cromatografiche in fase liquida ed è applicata principalmente a molecole di alto peso molecolare, poco o niente volatili e termicamente instabili.

La Ionizzazione Electrospray si realizza durante il passaggio di fase dell'analita dalla fase condensata liquida alla fase gassosa, attraverso un procedimento di nebulizzazione in uno spazio in cui è presente un campo elettrico di intensità di migliaia di Volt per centimetro. La soluzione dell'analita da ionizzare viene nebulizzata, utilizzando azoto compresso, attraverso un ugello che è posto ad una differenza di potenziale di circa 4kV. L'aerosol che viene a formarsi contiene delle goccioline di soluzione che subiscono una progressiva desolvatazione, in seguito alla quale il loro diametro diminuisce fino ad un valore critico (limite di Rayleigh) oltre il quale si ha la loro esplosione Colombiana. Questo processo, che avviene a pressione atmosferica, porta alla formazione di ioni molecolari variamente protonati in fase gassosa a partire da una soluzione liquida. In questo modo all'analizzatore arrivano cluster di ioni

molecolari protonati o deprotonati desolvatati ottenuti a pressione ordinaria. Poichè lo stato di carica dell'analita in soluzione è influenzato dal pH, a differenza della ionizzazione elettronica, la ionizzazione electrospray produce uno spettro di massa in cui per un singolo analita possono essere registrati più ioni quasi molecolari del tipo  $[M+Hn]^{+n}$  o  $[M-Hn]^{-n}$ . Infine, a differenza della Ionizzazione Elettronica, la tecnica di Ionizzazione Electrospray, non trasferendo un eccesso di energia nel processo di ionizzazione, non produce frammentazioni significative ed è considerata per questo una tecnica di ionizzazione *soft*.

### **MODALITÀ DI ACQUISIZIONE**

#### **4.3.1.3 MODALITÀ *FULL-SCAN* E A SCANSIONE DI IONI SELEZIONATI (SIM)**

I metodi di acquisizione che si possono scegliere nella spettrometria di massa sono diversi. La scelta è legata a considerazioni che riguardano il tipo di analisi da effettuare (qualitativa o quantitativa), la specificità e la sensibilità.

Indagini qualitative, tese all'identificazione e all'individuazione di sostanze incognite, rendono indispensabile la modalità di acquisizione *full-scan*, al fine di ottenere l'intero spettro di massa, ovvero l'impronta digitale della molecola in esame, oppure una serie di informazioni strutturali relative ad una molecola incognita.

I dati di uno spettro di massa *full-scan* di una sostanza derivano dall'acquisizione del segnale relativo a tutti gli ioni generati nella camera di ionizzazione dalla sostanza nel range di valori di  $m/z$  selezionato per l'analisi.

In un'analisi *full-scan* lo spettrometro esegue in sequenza l'acquisizione di una serie di spettri di massa, opera, cioè, una scansione ripetuta nell'intervallo di valori di  $m/z$  impostato e ogni singola scansione rappresenta uno spettro di massa. Se ad esempio, viene acquisito uno spettro per secondo e la presenza del campione nello spettrometro è di 30 secondi saranno acquisiti 30 spettri di massa. L'abbondanza relativa dei vari ioni in ogni scansione è sommata, la somma dei diversi ioni è riportata in sequenza in un cromatogramma di corrente ionica totale (Total Ion Current, TIC), il cui profilo è simile a quello ottenuto da un qualsiasi rivelatore cromatografico. Ogni picco presente sul TIC rappresenta un composto eluito dal sistema cromatografico collegato *on-line*, che può essere identificato dall'interpretazione del relativo spettro di massa.

Nello spettro *full-scan* in ascissa è posto il rapporto  $m/z$  e in ordinata l'abbondanza relativa dei vari segnali. Ogni segnale nello spettro di massa si riferisce ad un frammento o ione. Nell'analisi strutturale uno spettro di massa *full-scan* fornisce un quadro completo di informazioni ottenibili da una specie molecolare e consente, in linea di massima, la determinazione del peso molecolare e l'identificazione della molecola, grazie anche all'impiego di librerie di spettri di massa sempre più estese e facili da consultare.

Nel caso debbano essere effettuate analisi volte alla determinazione quantitativa di specifiche sostanze risulta preferibile adoperare una diversa tecnica di acquisizione. È, infatti, possibile ottenere una maggiore sensibilità quando, nel corso dell'analisi, viene riportato in diagramma solo la corrente ionica dovuta ai ioni specifici che caratterizzano la sostanza in esame, operando, cioè, una Scansione di Ioni Selezionati (Selected Ion Monitoring, SIM). Si possono, cioè, selezionare ed acquisire soltanto pochi ioni rappresentativi dell'analita d'interesse: ciò comporta una diminuzione del segnale dovuto al rumore di fondo e, di conseguenza, un aumento del rapporto segnale/rumore e, quindi, una migliore sensibilità nella rivelazione degli analiti -specialmente nel caso di matrici complesse- senza tuttavia perdere in specificità. L'aumento di sensibilità dipende anche dal fatto che la finestra di osservazione dei segnali diventa più stretta e, quindi, nello stesso tempo possono essere misurati più eventi. Se, ad esempio, viene acquisito uno ione ogni 50 millisecondi e la presenza del campione nello spettrometro di massa è di 30 secondi, è come se venissero acquisiti 600 spettri di massa. Inoltre, la specificità del riconoscimento dell'analita è garantita non solo dall'acquisizione dei segnali a valori di  $m/z$  dell'analita stesso, ma anche dalla misura del rapporto delle intensità relative dei frammenti acquisiti ai vari valori di  $m/z$ . Al fine di garantire un'identificazione univoca della molecola in esame, il rapporto tra le intensità relative dei frammenti ionici selezionati deve rispecchiare, entro un parametro di tolleranza del 5%, il rapporto tra le abbondanze relative tipiche dell'analita, che si ritrovano nello spettro di massa *full-scan*.

#### 4.3.1.4 SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS-MS)

Per indagare più in dettaglio la struttura degli ioni in fase gassosa e, quindi, la struttura dell'analita o per migliorare la specificità e la sensibilità dell'analisi quantitativa è possibile ricorrere ad un tipo particolare di spettrometria di massa, detta spettrometria di massa tandem (MS-MS). In questo caso, è possibile ottenere lo spettro di massa di ioni-prodotto derivanti dalla frammentazione di uno qualsiasi degli ioni (ione-precursore) presenti nello spettro di massa *full-scan*. In genere, per scopi quantitativi, è preferibile scegliere come ione-precursore quello più intenso nello spettro di massa *full-scan* in modo da selezionare la quasi totalità della corrente ionica generata dall'analita e non perdere in sensibilità. Con la spettrometria di massa tandem nel primo stadio di analisi lo ione precursore, avente un determinato rapporto  $m/z$ , viene selezionato ed isolato. Nel secondo stadio a tale ione viene fornita energia o per collisione o per radiazione elettromagnetica, inducendo la frammentazione dello stesso. Gli ioni prodotto risultanti, separati da un secondo analizzatore di massa sono rivelati ed acquisiti in uno spettro di massa tandem. Il processo, in alcune particolari apparecchiature, può essere ripetuto  $n$  volte, Spettrometria di Massa Multistadio o  $MS^n$ . Nell'analisi MS-MS è possibile registrare l'intero pattern di ioni frammento generati per scopi strutturali o, alternativamente per scopi analitici, monitorare una sola delle transizioni indotte. Quest'ultima modalità di acquisizione, analisi MS-MS con Registrazione di una Reazione Selezionata (Selected Reaction Monitoring, SRM), consente di aumentare ancora di più il rapporto segnale/rumore rispetto alla modalità MS-MS in cui si registri l'intero pattern di frammentazione.

È interessante notare che in un analizzatore a trappola ionica i vari esperimenti MS-MS possono essere condotti in successione temporale utilizzando un unico analizzatore, ed in questo caso si parlerà di spettrometria di massa tandem *in-time*. Nel caso di analizzatori quadrupolari, invece, è necessario utilizzare un analizzatore per ogni stadio ed in questo caso si parlerà di spettrometria di massa tandem *in-space*. Ad esempio, un esperimento che prevede due stadi di analisi con un analizzatore a quadrupolo richiede l'impiego di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

L'analisi MS-MS può essere anche usata per risolvere eventuali ambiguità nello spettro di massa *full-scan* o per evitare errori nell'analisi quantitativa. Se, infatti, al valore  $m/z$  di interesse il segnale presente nello spettro di massa *full-scan* o SIM è dovuto all'analita e ad un'impurezza, l'analisi MS-MS permette di discriminare tra analita ed impurezza: se si tratta di molecole diverse, selezionando lo ione-precursore comune e frammentandolo si ottengono ioni-prodotto diversi e caratteristici. Infine, se da un lato utilizzando la tecnica MS-MS

aumenta notevolmente la specificità è anche vero che la sensibilità diminuisce. Infatti, in ogni stadio dell'analisi MS-MS è selezionato un unico ione-precursore, quindi solo una parte dell'intera corrente ionica generata dall'analita. Ripetendo il processo più volte sarà registrata la corrente ionica di uno ione-prodotto dovuta ad una frazione sempre più piccola di quella totale. È, quindi, opportuno scegliere il giusto compromesso tra specificità e sensibilità.

#### **4.4 GAS CROMATOGRAFIA ACCOPPIATA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA CON IONIZZAZIONE ELETTRONICA (GC/EI-MS)**

Una miscela, introdotta in un gas cromatografo, viene separata nei suoi componenti che eluiscono lungo una colonna cromatografica capillare. Solitamente l'eluizione è monitorata mediante rivelatori a ionizzazione di fiamma e le sostanze eluenti vengono identificate unicamente in base ai relativi tempi di ritenzione (intervallo tra iniezione del campione e punto di massima risposta del rivelatore).

L'utilizzo come sistema di rivelazione di uno spettrometro di massa, direttamente collegato al gas cromatografo, consente, invece, di identificare univocamente ciascuna sostanza non solo in base al tempo di ritenzione, ma anche mediante il relativo spettro di massa<sup>48</sup>.

La spettrometria di massa si basa sulla rivelazione di ioni in fase gassosa in condizioni di vuoto spinto; pertanto, l'accoppiamento con un gas cromatografo (GC/MS), che già prevede campioni in fase gassosa, si realizza facilmente, attraverso l'utilizzo di dispositivi (transfer line) capaci di ridurre il flusso del gas di trasporto prima che venga raggiunta la sorgente di ionizzazione.

I dati acquisiti in un'analisi GC/MS consistono in una serie di spettri di massa registrati sequenzialmente. Per generare queste informazioni, lo spettrometro scandisce l'intervallo di massa selezionato in maniera ripetitiva durante il corso della cromatografia. L'abbondanza dei vari ioni in ogni spettro può essere sommata, e questa somma, riportata sequenzialmente in diagramma in funzione del tempo, fornisce il cromatogramma della corrente ionica totale (TIC, Total Ion Current), il cui aspetto è del tutto analogo a quello ottenuto mediante un qualsiasi rivelatore convenzionale. Ogni picco cromatografico, quindi, rappresenta generalmente un unico analita, che può essere identificato mediante l'interpretazione dello spettro di massa relativo.

## **4.5 ANALISI QUANTITATIVA**

### **4.5.1 STANDARD INTERNO E CURVE DI CALIBRAZIONE**

L'analisi quantitativa, condotta allo scopo di effettuare un monitoraggio biologico, consiste nella determinazione della concentrazione di un dato agente inquinante o di un suo metabolita nei fluidi biologici.

La determinazione quantitativa necessita di una retta di taratura, basata sull'analisi di campioni contenenti quantità note di analita. I campioni adoperati per la costruzione della retta di calibrazione vengono preparati simulando nei minimi dettagli le condizioni relative ad un prelievo reale. In particolare, per analiti o metaboliti urinari un campione di urina di un soggetto non professionalmente esposto all'agente in esame viene addizionato di soluzioni a concentrazione nota e variabile di analita e di una quantità nota e costante di uno "standard interno" appropriato.

L'utilizzo di una molecola quale standard interno rende i risultati di analisi condotte in più stadi (campionamento, estrazione, rivelazione GC/MS), indipendenti da eventuali errori di diluizione, dal recupero di estrazione, da variazioni del volume di campione introdotto nello strumento di analisi o da eventuali perdite di campione durante le varie fasi analitiche (Tabella 2.). L'indipendenza da tutti questi fattori deriva dal fatto che le rette di calibrazione vengono costruite riportando misure relative: sull'asse delle ascisse si riporta la concentrazione nominale dell'analita in ciascun campione; sull'asse delle ordinate i rapporti tra le aree dei picchi cromatografici relativi all'analita e allo standard interno. Qualsiasi errore introdotto durante l'intera procedura di analisi si rifletterà in maniera analoga sull'analita e sullo standard interno e il rapporto tra le aree dei due picchi cromatografici resterà pressoché invariato. Questo sarà tanto più vero quanto più lo standard interno scelto mostri proprietà chimico-fisiche simili all'analita. In questo caso, infatti, analita e standard interno saranno caratterizzati dagli stessi recuperi di estrazione e, nel caso si usi uno spettrometro di massa come rivelatore, dalla stessa resa di ionizzazione, ottenendo, complessivamente, una risposta simile tra analita e standard interno.

Dall'equazione della retta di taratura e dai coefficienti di correlazione si verifica la linearità delle curve di calibrazione negli intervalli di concentrazione presi in esame. La concentrazione degli analiti in campioni incogniti viene calcolata inserendo i valori misurati dei rapporti tra le aree dei picchi cromatografici dell'analita e dello standard interno nell'equazione della curva di calibrazione: il valore di concentrazione dell'analita nel campione incognito è dato dal valore della  $x$  nell'equazione.



**TABELLA 2.** STANDARD INTERNI ADOPERATI PER LA QUANTIFICAZIONE DELLE SOSTANZE DI ABUSO IN MATRICE URINARIA E IN MATRICE CHERATINICA.

| ANALITA                          | STANDARD INTERNO                           |
|----------------------------------|--|
| Cocaina                          | Scopolamina                                |
| Benzoilecgonina                  |  |
| Ecgonina metilestere             |  |
| Acido tetraidrocannabinolo       | Acido tetraidrocannabinolo deuterato       |
| Morfina                          | Nalorfina                                  |
| Codeina                          |  |
| Acido $\gamma$ -idrossibutirrico | Acido $\gamma$ -idrossibutirrico deuterato |

## 5. PROCEDURE ANALITICHE

### 5.1 REATTIVI E STRUMENTAZIONE

La codeina (COD) è stata acquistata dalla RADIANT, benzoilecgonina (BE), ecgoninametilestere (EME), morfina (MOR), nalorfina (NAL), cocaina (COC) e scopolamina (SCOP) dalla Alltech. L'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico (GHB), acido  $\gamma$ -idrossibutirrico deuterato (GHBd<sub>6</sub>), l'acido tetraidrocannabinolo (THCCOOH), l'acido tetraidrocannabinolo deuterato (THCCOOHd<sub>3</sub>), sono stati forniti dalla Promochem (Molsheim, France).

Il BSTFA + 1% TMCS (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide + 1% trimetilclorosilossano), l'anidride eptafluorobutirrica (HFBA) e il pentafluoro1-propanolo (PFPOH) sono state acquistate dalla Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France).

I solventi, gli acidi e le basi utilizzati sono della Carlo Erba (Milano, Italy).

Per l'estrazione in fase solida dall'urina e dai capelli sono state usate: i) colonne SPE, Solid Phase Extraction, del tipo Strata Screen A (Strong Anion Exchange), 200 mg/3ml trifunzionalizzate, non end-capped (Phenomenex); ii) colonna SPE, Solid Phase Extraction, del tipo Strata Screen C (Strong Cationic Exchange), 200 mg/3ml trifunzionalizzate, non end-capped (Phenomenex).

L'analisi GC-MS è stata effettuata adoperando un gas cromatografo TRACE GC serie 2000 accoppiato ad uno spettrometro di massa a trappola ionica PolarisQ della Thermo Electron Corporation (San José, CA, USA), gestiti dal programma Xcalibur® versione 1.1 (Thermo Electron Corporation), per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati. La colonna capillare utilizzata per la gas cromatografia è una Zebron ZB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m), della Phenomenex (St. Torrance, CA, USA).

Le analisi LC-MS sono state condotte con un sistema modulare HPLC serie 1100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) e uno spettrometro di massa dotato di sorgente ionica electrospray, LCQ<sup>DECA</sup> della ditta Thermo Electron Corporation, gestiti dal programma Xcalibur® versione 1.3, per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

## 5.2 SOLUZIONI DEGLI ANALITI

### 5.2.1 SOLUZIONI A TITOLO NOTO: METANOLICHE E IN MATRICI COMPLESSE

Le soluzioni degli analiti sono state preparate a partire da soluzioni metanoliche fornite dalle ditte, tutte a concentrazione di 1mg/ml. Le soluzioni metanoliche standard a titolo noto degli analiti e degli standard interni sono state diluite separatamente in modo da ottenere soluzioni madre di concentrazione 500 ng/μl.

Le soluzioni sono state ulteriormente diluite per ottenere soluzioni di lavoro a concentrazione decrescente. Questa modalità di lavoro è risultata essere differente per i diversi analiti e per le diverse matrici adoperate.

La preparazione dei campioni urinari delle soluzioni metanoliche di COC, BE, EME, MOR e COD ha previsto diluizioni successive partendo dalla soluzione madre di 500 ng/μl e ottenendo concentrazioni di 72.0, 36.0, 18.0, 9.0, 4.5 ng/μl. Allo stesso modo sono state ottenute soluzioni a titolo noto e costante di SCOP e di NAL, (standard interni), pari a 25ng/μl. Per quanto riguarda il THCCOOH dalle soluzioni madre di analita e di standard interno sono state ottenute soluzioni di THCCOOH a concentrazioni pari a 14.4, 7.2, 3.6, 1.8, 0.9, 0.45 ng/μl e una soluzione a titolo noto e costante di THCCOOHd<sub>3</sub> pari a 2 ng/μl. Infine, la soluzione di partenza a concentrazione di 500 ng/μl di GHB è stata diluita per la preparazione di soluzioni a concentrazione paria a 480, 240, 120, 60, 30 ng/μl di GHB e il GHB-d<sub>6</sub> è stato preparato dalla soluzione madre fino ad ottenere una soluzione a concentrazione di 100 ng/μl.

Per la costruzione delle rette in matrice cheratinica, invece, sono state preparate soluzioni degli analiti aventi le medesime concentrazioni. Dalle soluzioni madre degli analiti sono state preparate per diluizioni successive soluzioni a concentrazioni di 12, 6, 3, 1.5, 0.75 ng/μl; mentre le soluzioni degli standard interni hanno previsto concentrazioni pari a di 10 ng/μl.

Per la preparazione di soluzioni a titolo noto di ciascun analita in urina e nei capelli e/o peli ascellari sono stati utilizzati *pool* di urina e di capelli (e/o peli ascellari) di donatori non dediti all'uso di sostanze stupefacenti. Opportuni volumi delle soluzioni metanoliche a titolo noto sono stati addizionati alle urine e alla matrice pilifera di donatori non dediti all'uso di droghe. Per entrambi i casi sono stati aggiunti volumi costanti delle soluzioni di standard interno.

### 5.2.2 TRATTAMENTO DEI CAMPIONI URINARI E IN MATRICE CHERATINICA

#### *Matrice urinariria*

A 3 ml di urina vanno aggiunti 50 µl di soluzioni metanoliche di partenza, precedentemente descritte, degli analiti e 50 µl delle soluzioni di standard interni. Nel caso del THCCOOH, in questo modo, si ottengono concentrazioni urinarie di 240, 120, 60, 30, 15 ng/ml; mentre, operando allo stesso modo, le concentrazioni urinarie di cocaina, morfina e dei loro metaboliti risultano essere pari a 1200, 600, 300, 150, 75 ng/ml; infine, le concentrazioni urinarie ottenute per il GHB sono state pari a 8, 4, 2, 1, 0.5 µg/ml.

I campioni urinari di morfina sono stati addizionati con 1 ml di HCl al 37% e posti in un bagnetto a pressione ad una temperatura di 120°C per 20 minuti. Mediante la reazione di idrolisi così descritta è stato possibile staccare l'analiti dal composto.

Nel caso di urine provenienti da soggetti assuntori di droghe, a ciascun campione sono stati aggiunti 50 µl delle soluzioni di standard interno opportuno a seconda dell'analita da determinare.

#### *Matrice cheratinica*

I capelli e i peli ascellari, provenienti da soggetti non utilizzatori, vengono sottoposti a lavaggio con metanolo, asciugati sotto blando flusso di azoto e, infine, finemente sminuzzati e pesati. Alla quantità di matrice cheratinica pesata, pari a 50 mg, vanno aggiunti 50 µl delle soluzioni a titolo noto e variabile di ciascun analita e 50 µl delle soluzioni (10 ng/µl) di standard interni e i campioni vanno portati a completa secchezza mediante un blando flusso di aria.

Successivamente si effettua un'idrolisi in condizioni acide (1 ml di HCl 0.1N, incubato a 45°C per 18h, sotto agitazione), nel caso di cocaina e morfina, mentre si esegue un'idrolisi in ambiente basico (500 µl di NaOH 1M, incubazione a 95°C per 15 minuti) nel caso della cannabis e dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico.

Dopo aver raffreddato i campioni contenenti cocaina e/o morfina, è stato aggiunto 1 ml di soluzione tamponante 0.1M e 1-2 gocce di NaOH 2N (il pH della soluzione finale deve essere circa 7) e centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti.

Nel caso delle matrici provenienti da soggetti assuntori di droghe, a ciascuna quantità di campione (50 mg) vanno aggiunti 50  $\mu$ l delle soluzioni di standard interno opportuno.

## CONDIZIONI ANALITICHE

### 5.3.1 ESTRAZIONE DEGLI ANALITI DALLA MATRICE CHERATINICA E DALLE URINE:

#### ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO E IN FASE SOLIDA.

Nella tabella 3 sono riportate le procedure di estrazione applicate per i campioni preparati in matrice urinaria e per quelli preparati in matrice pilifera. Le stesse procedure sono state adoperate per la quantificazione degli analiti in campioni di soggetti assuntori di sostanze stupefacenti, per i campioni adoperati per la valutazione dei parametri di accuratezza, specificità, sensibilità, precisione e linearità della risposta.

**TABELLA 3. PROCEDURE DI ESTRAZIONE PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANALITI DALLE MATRICI COMPLESSE**

| SOSTANZA                 | URINA   | CAPELLI E/O PELI ASCELLARI   |
|--------------------------|---|--|
| THCCOOH                  | <b>Estrazione in fase solida (SPE): ScreenA 200mg/3ml</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Condizionamento: 1 ml di metanolo, 1ml sodio acetato 0,1M, 5% di metanolo</li> <li>• 3 ml di urina in presenza dell'analita e dello standard interno</li> <li>• Lavaggio: 2ml soluzione al 60% di metanolo</li> <li>• Eluizione: 2ml esano/etil acetato (75:25,v:v) al 1% acido acetico glaciale</li> <li>• L'eluato va portato a secco con flusso di N<sub>2</sub></li> </ul> | <b>Estrazione liquido-liquido</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 ml di una soluzione di esano/etilacetato (75:20,v:v) aggiunti a 50 mg di capelli addizionati dell'analita e dello standard interno</li> <li>• Agitazione del campione per 10min</li> <li>• La fase organica va portata a secco con N<sub>2</sub></li> </ul>             |
| COC, BE, EME<br>MOR, COD | <b>Estrazione in fase solida (SPE): Screen C 200mg/3ml</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Condizionamento: 2ml di metanolo + 2ml tampone fosfato 0.1M pH6</li> <li>• 3ml di urina (o 50 mg di capelli) in presenza dell'analita e dello standard interno</li> <li>• Lavaggio: 6ml acqua, 3ml HCl 0.1M, 9ml metanolo</li> <li>• Eluizione: 2ml cloruro di metilene/metanolo (80:20, v:v)</li> <li>• L'eluato va portato a secco con flusso di N<sub>2</sub></li> </ul>   |  |
| GHB                      | <b>Estrazione liquido-liquido</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 3ml di etilacetato vanno aggiunti a 2ml di urina (pH 2,75) in presenza dell'analita e dello standard interno</li> <li>• 1ml di trisodio acetato buffer (pH 2,75)</li> <li>• Sotto agitazione per 15min</li> <li>• Centrifugare a 2000rpm per 10 min</li> <li>• Recupero della fase organica e successivamente portata a secchezza sotto flusso di N<sub>2</sub></li> </ul>                             | <b>Estrazione liquido-liquido</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 ml di una soluzione di esano/etilacetato (75:20,v:v) aggiunti a 50 mg di capelli addizionati dell'analita e dello standard interno</li> <li>• Agitazione del campione per 10min</li> <li>• La fase organica va portata a secco sotto flusso di N<sub>2</sub></li> </ul> |

### 5.3.2 REAZIONE DI DERIVATIZZAZIONE

#### *Derivatizzazione con N,O-bis (trimetilsilil) trifluoro-acetamide (BSTFA)*

La reazione di derivatizzazione con BSTFA è stata condotta sia per i campioni preparati in soluzione metanolica, adoperati per la valutazione della specificità del metodo analitico degli analiti, sia per i campioni estratti dalle urine e dai capelli. Una volta portati a secchezza si aggiungono 50 µl di BSTFA e tempestivamente posti in bagno termostato.

In tabella 4 si riportano le condizioni di tempo e temperatura adoperate per le reazioni di derivatizzazione.

Terminata la reazione, il BSTFA in eccesso deve essere allontanato mediante un'estrazione liquido-liquido: si aggiungono 2 ml acqua per neutralizzare il BSTFA e, successivamente, si aggiunge 1 ml di diclorometano. La fase acquosa, che in linea teorica contiene in reagente è, quindi, allontanata e la fase organica portata a secco sotto un blando flusso di azoto. Il residuo va ripreso con 50 µl di etilacetato. Tale procedura non può essere adoperata nel caso del GHB.

**TABELLA 4.** PARAMETRI DI OTTIMALI PER LA FORMAZIONE DEI SILIL-DERIVATI

| SOSTANZA                         | TEMPERATURA<br>(°C) | TEMPO<br>(min) |
|----------------------------------|---------------------|----------------|
| $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo | 90                  | 15             |
| Cocaina e metaboliti             | 75                  |                |
| Eroina e metaboliti              |                     |                |
| Acido $\gamma$ -idrossibutirrico |                     |                |

### *Derivatizzazione con anidride eptafluorobutirrica (HFBA)*

La reazione di derivatizzazione è stata effettuata aggiungendo al campione in analisi 100 µl di etilacetato e 100 µl di HFBA e ponendo la miscela così ottenuta in bagno termostato a 75°C per 20 min. La soluzione è stata quindi portata a secco e ripresa con 50 µl di etilacetato.



### 5.3.3 RIVELAZIONE DELL'ACIDO $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO MEDIANTE LC/ESI/MS

L'infusione diretta del campione di acido  $\gamma$ -idrossibutirrico nello spettrometro di massa è stata condotta utilizzando una temperatura del capillare di 220° C ed un flusso di 5  $\mu$ L/min.

L'analisi in cromatografia liquida ad alte prestazioni dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico è stata condotta utilizzando una miscela contenente quantità variabili di una soluzione acquosa di acido formico 0.1%, (Tampone A), e metanolo, (Tampone B), secondo il seguente programma:

10% B  $\xrightarrow{2\text{min}}$  10% B  $\xrightarrow{22\text{min}}$  90% B  $\xrightarrow{32\text{min}}$  90% B.

L'analita eluito dalla colonna e introdotto nella sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa ad un flusso di 200  $\mu$ L/min è stato analizzato utilizzando una ionizzazione electrospray (ESI) regolando la temperatura della sorgente di ionizzazione a: i) 300 °C, il voltaggio dello spray a 5 V; ii) 120 °C e Voltaggio spray 3V ed acquisendo l'intera corrente ionica prodotta nel range di  $m/z$  (50-500), ovvero utilizzando la modalità di acquisizione *full-scan*.

### 5.3.4 RIVELAZIONE DEGLI ANALITI MEDIANTE ANALISI GC/EI-MS, MS-MS E SIM

Nell'analisi GC/MS sono state ottimizzate sia le condizioni di gas cromatografia sia di spettrometria di massa.

Il campione, introdotto mediante iniezione splitless, ha previsto la seguente programmate di temperatura per tutti e sette gli analiti:

100°C  $\xrightarrow{1\text{min}}$  100°C  $\xrightarrow{40^\circ\text{C}/(\text{min})}$  180°C  $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$  290°C  $\xrightarrow{5\text{min}}$  290°C.

L'elio è stato adoperato quale gas di trasporto, settando un flusso di 1 mL/min e la temperatura dell'iniettore settata a 240°C.

Gli analiti eluiti dalla colonna cromatografica giungono attraverso una *transfer line*, la cui temperatura è stata settata a 260 °C, nella sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa, caratterizzata da una temperatura di 200 °C, e sono ionizzati mediante ionizzazione elettronica, attraverso l'applicazione di un potenziale di 70 eV ed una corrente di emissione di 200  $\mu$ A.

### *Acquisizioni:*

Le acquisizioni per la caratterizzazione di tutti gli analiti sono state condotte in modalità *full-scan* (range  $m/z$  50-800).

Per l'analisi quantitativa dei sililderivari di GHB e di THCCOOH è stata scelta la modalità di acquisizione MS/MS: gli spettri di massa sono stati ottenuti selezionando uno ione precursore caratteristico, frammentandolo con opportuna energia e infine, acquisendo uno o più ioni prodotto. Per i sililati di cocaina, morfina e dei loro metaboliti è stata scelta la modalità di acquisizione MS-SIM

In Tabella 5 è schematizzato il metodo di acquisizione di massa per l'analisi GC/EI/MS-MS e GC/EI/MS-SIM per ciascuno degli analiti.

**TABELLA 5.** PARAMETRI DI ACQUISIZIONE: SCANSIONE DI IONI SELEZIONATI (SIM) E SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS/MS).

| SEGMENTI     | TEMPO (MIN.) | SIM ( $m/z$ )       | MS/MS ( $m/z$ )                            | ANALITA               |
|--------------|--------------|---------------------|--|-----------------------|
|              |              | 82.1, 96.2, 240.2   |  | EME                   |
| Segmento I   | 3.00-9.00    |                     | Ione precursore: 233.2 ( $m/z$ )           |                       |
|              |              |                     | Tempo di isolamento: 12ms                  |                       |
|              |              |                     | Voltaggio di eccitazione: 0.8 Volt         | GHB                   |
|              |              |                     | Ioni prodotto: 147.3, 159.3( $m/z$ )       |                       |
|              |              |                     | Ione precursore: 239.2 ( $m/z$ )           |                       |
|              |              |                     | Tempo di isolamento: 12ms                  |                       |
|              |              |                     | Voltaggio di eccitazione: 0.8 Volt         | GHBd <sub>6</sub>     |
|              |              |                     | Ioni prodotto: 153.3, 165.3( $m/z$ )       |                       |
| Segmento II  | 9.05-9.60    | 82.2, 182.1, 303.0  |  | COC                   |
| Segmento III | 9.62-10.11   | 82.2, 240.2, 361.3  |  | BE                    |
| Segmento IV  | 10.13-11.00  | 94.1, 138.1, 154.1  |  | SCOP                  |
| Segmento V   | 11.10-11.45  | 313.2, 343.2, 371.2 |  | COD                   |
| Segmento VI  | 11.47-12.00  | 401.2, 414.2, 429.1 |  | MOR                   |
|              |              | 414.2, 440.2, 455.1 |  | NAL                   |
| Segmento VII | 12.02-22.0   |                     | Ione precursore: 488.9( $m/z$ )            |                       |
|              |              |                     | Tempo di isolamento:12ms                   |                       |
|              |              |                     | Voltaggio di eccitazione:0.9 Volt          | THCCOOH               |
|              |              |                     | Ioni prodotto:371.1,398.0,473.0 ( $m/z$ )  |                       |
|              |              |                     | Ione precursore: 491.9( $m/z$ )            |                       |
|              |              |                     | Tempo di isolamento: 12ms                  |                       |
|              |              |                     | Voltaggio di eccitazione: 0.9Volt          | THCCOOHd <sub>3</sub> |
|              |              |                     | Ioni prodotto:374.3,341.0,4.76.0 ( $m/z$ ) |                       |

## 6. RISULTATI

### 6.1 GHB: EQUILIBRIO CON LA FORMA LATTONICA

Nel corso del primo anno di dottorato si è presentata la problematica inerente alla trasformazione dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico in forma lattonica ( $\gamma$ -butirrolattone, GBL) in campioni acquosi e in matrice urinaria. Dai diversi studi di letteratura condotti *in vivo* sul metabolismo e sul meccanismo di azione del GHB, si evince che il  $\gamma$ -butirrolattone, presente come sostanza endogena nel cervello dei mammiferi, è uno dei precursori del GHB. Di conseguenza, si è reso necessario distinguere le due sostanze nella matrice biologica.

A tale scopo sono stati condotti esperimenti per determinare quali sono le condizioni di lavoro più idonee per identificare e quantificare inequivocabilmente il GHB nelle urine. Gli spettri di massa ESI-MS *full-scan*,  $MS^2$  ed  $MS^3$  sono stati ottenuti inizialmente per infusione diretta nello spettrometro di massa di una soluzione metanolica di concentrazione di 25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , portata a pH 2.5, al fine di ottimizzare le condizioni di eccitazione e di frammentazione. Acquisendo gli ioni positivi lo spettro di massa ESI-MS *full-scan*, l'analita ha mostrato la presenza di un segnale ad  $m/z$  104.9, relativo allo ione pseudomolecolare,  $[M+H]^+$  (formatosi dopo coordinazione da parte dell'analita di uno ione  $H^+$ ) e di un segnale ad intensità relativa maggiore ad  $m/z$  87.0, la cui natura è stata indagata mediante analisi  $MS^2$  ed  $MS^3$  (Fig. 9).

Il segnale a valore di  $m/z$  87.0 potrebbe derivare sia dalla frammentazione in sorgente dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico con conseguente perdita di una molecola di acqua,  $[M-18]^+$ , oppure rappresentare la forma lattonica dell'acido dissociato. Per l'identificazione del segnale sono stati condotti prima esperimenti  $MS^2$  ed  $MS^3$  sullo ione  $m/z$  104.9 (Fig. 10, pannelli A e B, rispettivamente). Lo spettro  $MS^2$  dello ione  $m/z$  104.9 mostra un unico segnale, relativo allo ione ad  $m/z$  87.0. Selezionando quest'ultimo quale secondo ione precursore dell'analisi  $MS^3$  è stato ottenuto un unico segnale relativo allo ione ad  $m/z$  68.7. Si è poi proceduto all'analisi  $MS^2$  dello ione ad  $m/z$  87.0 presente nello spettro *full-scan* dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico (Fig. 10, pannello C). Lo spettro di frammentazione ha mostrato anche in questo caso un unico segnale ad  $m/z$  68.7, lasciando supporre che lo ione ad  $m/z$  87.0 presente nello spettro *full-scan* dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico sia da attribuire sia ad una parziale frammentazione dello stesso in sorgente sia alla compresenza del lattone relativo.

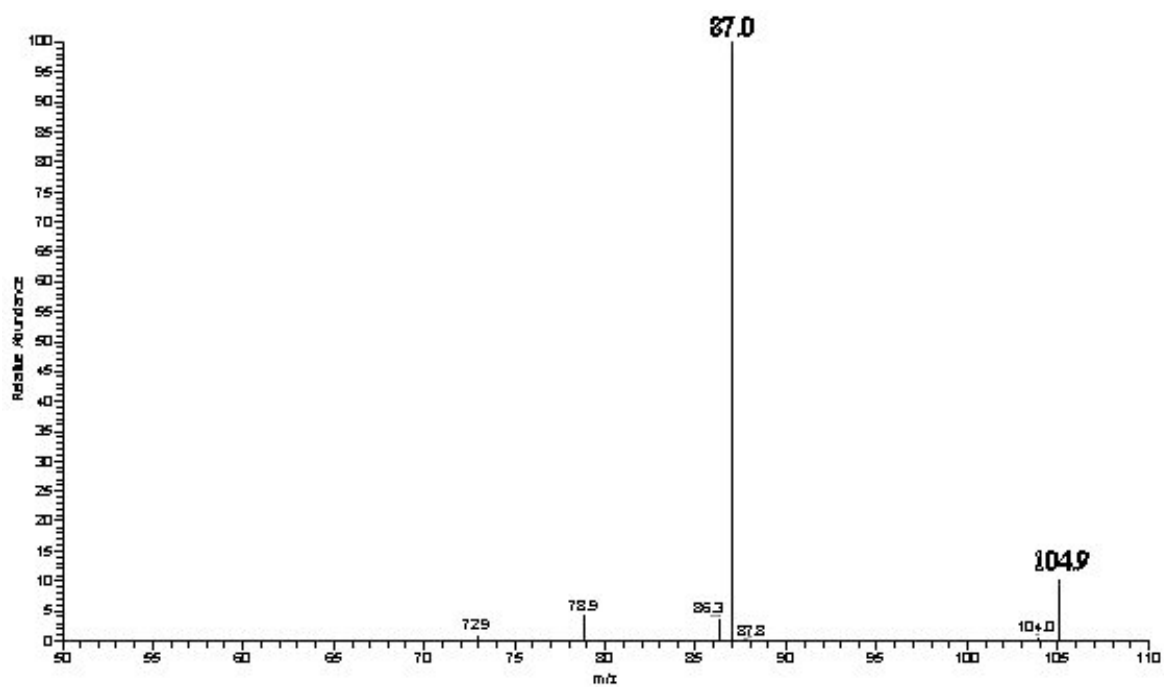
La natura dello ione a  $m/z$  87.0 presente nello spettro *full-scan* dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico è stata ulteriormente investigata ripetendo l'esperimento *full-scan* utilizzando

una temperatura del capillare più bassa, 120 °C, ed un minor voltaggio dello spray, 3 V, in modo minimizzare i fenomeni di frammentazione in sorgente, dal momento che l'energia in gioco per la nebulizzazione del campione è minore. In figura 11 sono mostrati gli spettri ESI-MS *full-scan* ottenuti nei due casi: i) temperatura capillare 220 °C e Voltaggio spray 5V, pannello A; ii) temperatura capillare 120 °C e Voltaggio spray 3V, pannello B. Come atteso, i risultati hanno mostrato un aumento dell'intensità relativa del segnale corrispondente allo ione pseudomolecolare  $[M+H]^+$ , supportando l'ipotesi che lo ione ad  $m/z$  87.0 presente nello spettro di massa *full-scan* dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico registrato nelle precedenti condizioni derivi effettivamente della frammentazione in sorgente dell'analita stesso.

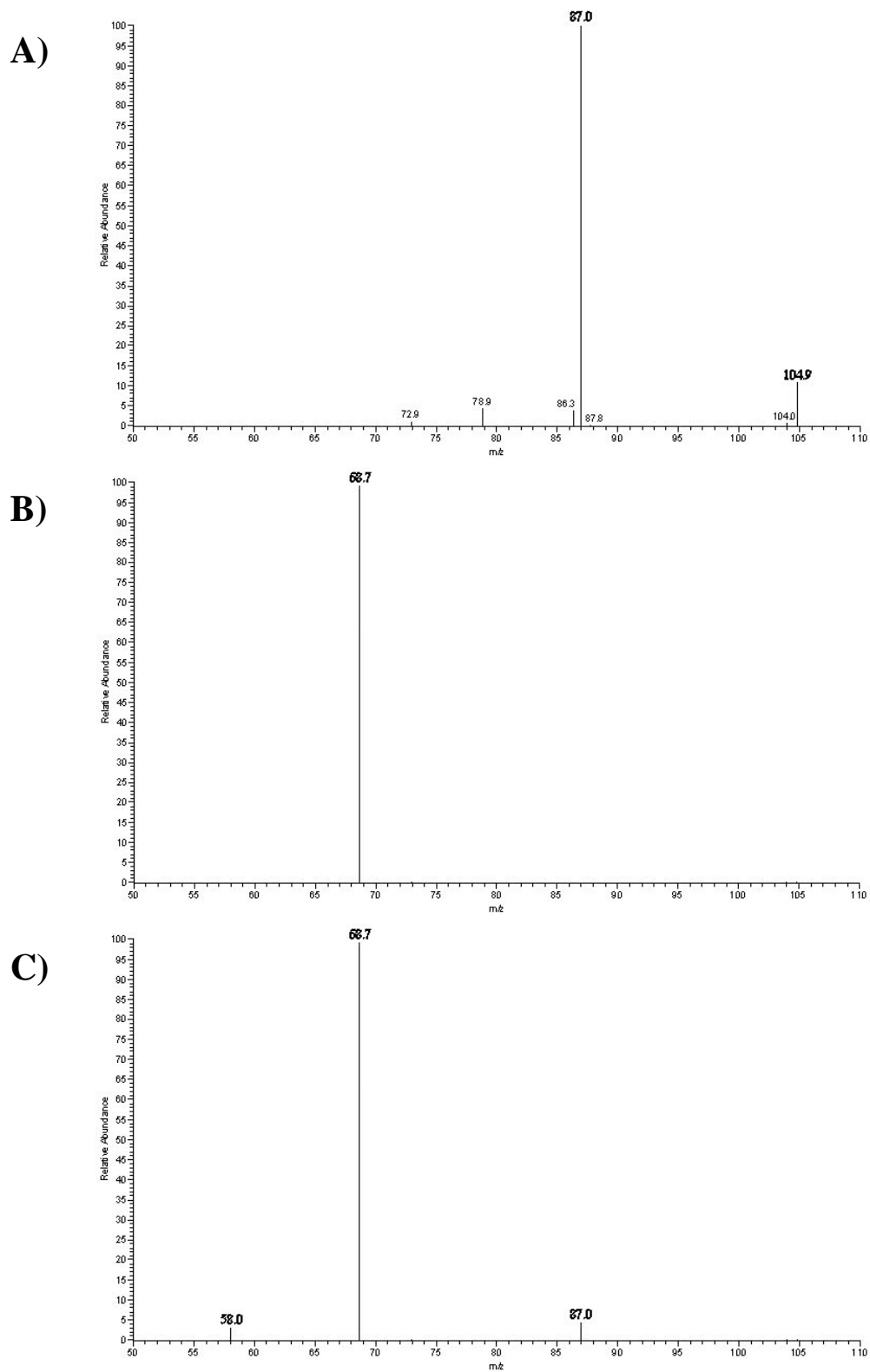
Inoltre, in linea teorica aumentare il valore di pH di una soluzione acida significa trasformare l'analita in forma dissociata, quindi, se nella soluzione coesistono le due forme (l'acido e la il lattone in questione) gli spettri di massa dovrebbero presentare più segnali diversi. Il pH della soluzione è stato portato a 4 con un'opportuna base organica. Lo spettro di massa LC/ESI-MS *full-scan* con acquisizione degli ioni negativi ha evidenziato solo la presenza del segnale corrispondente al valore di  $m/z$  103.0, che rappresenta il valore di massa ionica dell'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico.

Queste indagini effettuate sia per campioni urinari sia per quelli in soluzione metanolica di GHB hanno mostrato che la matrice scelta necessita di condizioni di lavoro in cui i valori di pH devono essere costantemente bassi (pH acido).

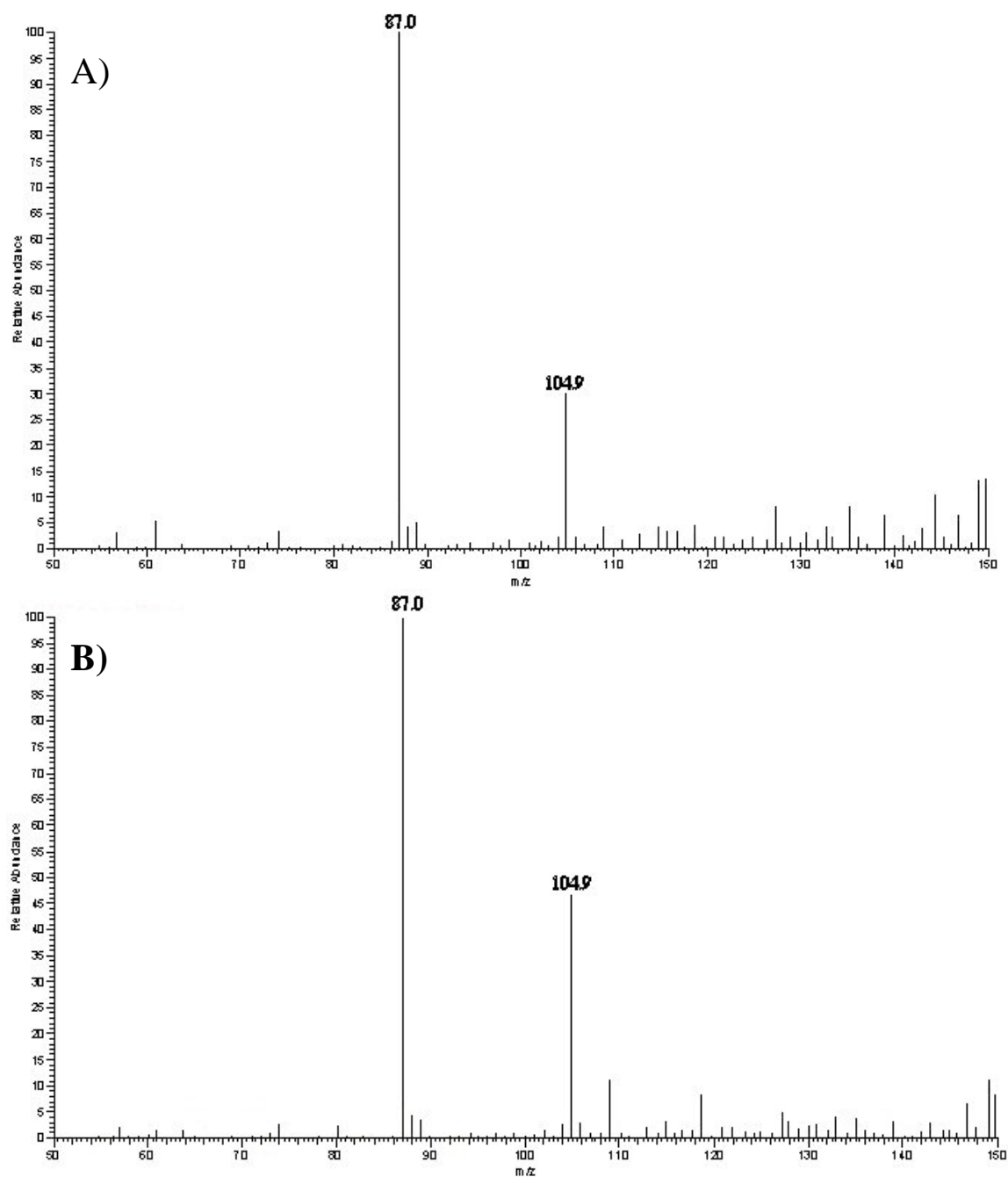
**FIGURA 9.** SPETTRO DI MASSA ESI-MS *FULL-SCAN* DEL GHB



**FIGURA 10.** SPETTRI ESI-MS<sup>N</sup> DEL GHB: PANNELLO A, MS<sup>2</sup> IONE PRECURSORE  $m/z$  104.9, RANGE DI ACQUISIZIONE  $m/z$ (50-110); PANNELLO B, MS<sup>3</sup> PRIMO IONE PRECURSORE  $m/z$  104.9, SECONDO IONE PRECURSORE  $m/z$  87.0, RANGE DI ACQUISIZIONE  $m/z$ (50-110); PANNELLO C, MS<sup>2</sup> IONE PRECURSORE  $m/z$  87.0, RANGE DI ACQUISIZIONE  $m/z$ (50-110).



**FIGURA 11.** SPETTRO DI MASSA ESI-MS FULL-SCAN DEL GHB REGISTRATO UTILIZZANDO TEMPERATURA CAPILLARE 220 °C E VOLTAGGIO SPRAY 5V, PANNELLO A; TEMPERATURA CAPILLARE 120 °C E VOLTAGGIO SPRAY 3V, PANNELLO B.





## 6.2 DERIVATIZZAZIONE

### *Derivatizzazione con N,O-bis (trimetilsilil) trifluoro-acetamide (BSTFA)*

L'analisi in gas cromatografia (GC) degli analiti in esame prevede che essi siano resi volatili mediante un'appropriata derivatizzazione delle funzioni ossidriliche presenti nelle molecole. Tale reazione è necessaria per tutti quei composti che presentino gruppi funzionali con idrogeni attivi quali  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}$ ,  $-\text{SH}$ . Questi mostrano una spiccata tendenza a formare legami idrogeno intermolecolari e quindi riducono la volatilità dei composti che li contengono nonché interagiscono pericolosamente con la fase stazionaria della colonna cromatografica. Pertanto la reazione di derivatizzazione ha lo scopo di rendere i composti adatti all'analisi GC, riducendone la polarità e, allo stesso tempo, migliorandone la separazione.

La derivatizzazione è indispensabile per gli oppiacei, il cui capostipite, la morfina, possiede ben due funzioni ossidriliche; è richiesta anche per i metaboliti della cocaina, i quali presentano una funzione carbossilica (BE) o una funzione ossidrilica (EME); inoltre, per il metabolita del cannabinolo con funzione carbossilica (THCCCOH) e per l'acido  $\gamma$ -idrossibutirrico, che presenta sia una funzione ossidrilica, sia una carbossilica. Fa, invece, eccezione la cocaina che è una molecola già di per se apolare, sufficientemente volatile da essere analizzata in gas cromatografia senza previa derivatizzazione.

Tra i derivatizzanti solitamente adoperati, il metodo proposto dal "progetto di dottorato", ha scelto uno dei sililanti più reattivi, il BSTFA. Le temperature connesse con la reazione di derivatizzazione, sebbene elevate non hanno comportato alcuna degradazione termica degli analiti (dati non mostrati), i quali sono stati analizzati in GC/MS come mono o bis-trimetilsilil-derivati, eccezion fatta per la cocaina, non suscettibile di derivatizzazione.

### *Derivatizzazione con anidride eptafluorobutirrica (HFBA)*

L'interazione tra l'anidride eptafluorobutirrica e gli analiti in esame comporta l'addizione di gruppi  $-\text{CO}-\text{CF}_2-\text{CF}_2-\text{CF}_3$ .

L'identificazione degli analiti derivatizzati con HFBA è stata effettuata mediante spettrometria di massa, acquisendo la corrente ionica totale in modalità *full-scan*. Le condizioni cromatografiche sono state ottimizzate al fine di separare gli analiti e allo stesso tempo ridurre i tempi di analisi.

Le analisi dei derivati eptafluorobutirrici non hanno mostrato picchi cromatografici ben separati, e risolti degli analiti. Di conseguenza, ciò non ha consentito di adoperare l'analisi GC/EI/MSSIM e GC/MSMS dei derivati eptafluorobutirrici degli altri analiti per la quantificazione nelle matrici complesse.

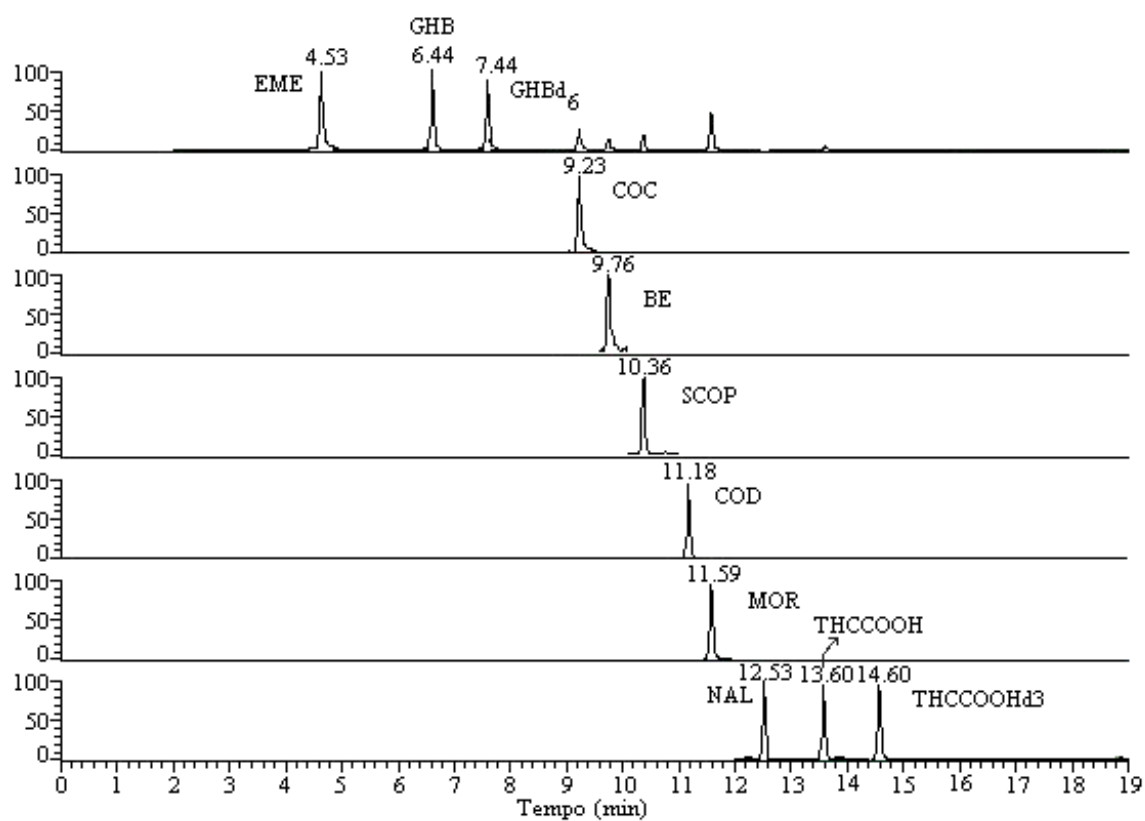
### **6.3 OTTIMIZZAZIONE DELLA GAS CROMATOGRAFIA**

Le condizioni cromatografiche (tipo di colonna e gradiente di temperatura appropriato) sono state leggermente variate rispetto ai metodi indicati dalla letteratura, al fine di effettuare un'analisi simultanea dei composti, ottimizzare la separazione degli analiti e, allo stesso tempo, ridurre i tempi di analisi.

La messa a punto delle condizioni di temperatura relative all'iniettore ed alla transfer line è risultata critica al fine di evitare la frammentazione in più picchi cromatografici nel caso dell'ecgonina metilestere e lo scodamento del picco relativo alla benzoilecgonina (dati non mostrati), probabilmente attribuibili ad una parziale degradazione termica o all'accumulo degli analiti all'interno dell'iniettore stesso.

In figura 12 si riporta il cromatogramma relativo all'analisi GC/MS-*full-scan* di una miscela di una soluzione standard (10 ng/μl) degli analiti. I picchi risultano simmetrici e complessivamente ben separati, sebbene l'intervallo di tempo che intercorre tra l'eluizione della codeina e della morfina risulti ridotto. La separazione cromatografica ottenuta ha consentito di adoperare sette differenti segmenti di acquisizione nell'analisi MS, ciascuno relativo ad un unico analita.

**FIGURA 12.** CROMATOGRAMMA DI UNA SOLUZIONE STANDARD 10 ng/μl DEI SILIL DERIVATI  
DEGLI ANALITI



### 6.3.1 SPETTRI DI MASSA EI/FULL-SCAN DEI SILIL-DERIVATI

Le condizioni operative dello strumento adoperato per l'analisi sono state regolate al fine di ottenere spettri di massa del tutto corrispondenti a quelli riportati in letteratura, cioè conservando il pattern di frammentazione e soprattutto le stesse intensità relative fra gli ioni frammento. La standardizzazione delle condizioni operative rende comparabile l'analisi interlaboratorio, in termini di riproducibilità e sensibilità dell'analisi.

Gli esperimenti condotti in GC/MS-EI-*full-scan* sono stati adoperati per riconoscere ciascun composto e determinarne il tempo di ritenzione. Eccezion fatta per la cocaina, tutti gli spettri di massa riportati si riferiscono ai trimetilsilil-derivati delle sostanze analizzate.

Lo spettro della cocaina (Fig. 13 a) mostra il picco base, cui corrisponde una abbondanza relativa del 100%, ad un valore di  $m/z$  di 82.2 e altri due segnali significativi: uno a  $m/z$  182.1 e un altro a  $m/z$  303.0, corrispondenti, rispettivamente, al 75% e al 10% del picco base. Dato che il frammento ad  $m/z$  82.2 e quello a  $m/z$  182.1 sono presenti sia nello spettro di massa della cocaina che in quelli dei suoi metaboliti (il primo è comune a tutte e tre le molecole, il secondo alla cocaina e all'EME), la presenza dello ione ad  $m/z$  303.0 è indispensabile per l'identificazione della sostanza.

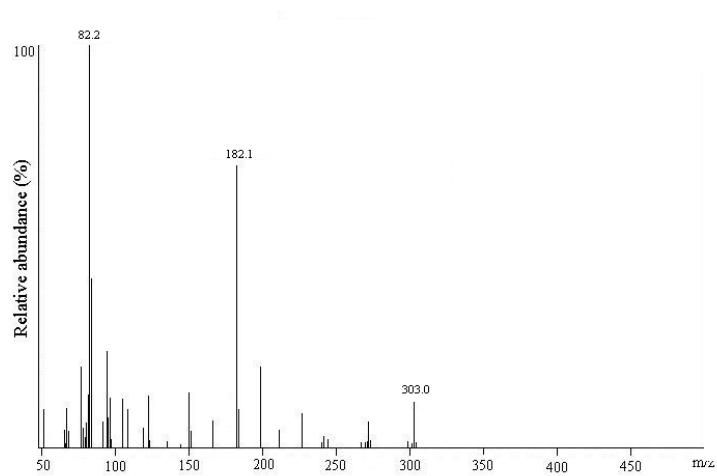
La figura 13 b) mostra lo spettro di massa *full-scan* dell'EME. Anch'esso presenta un picco base a  $m/z$  82.1 e due picchi più specifici a  $m/z$  96.2 e 240.2, con intensità relative rispettivamente del 45% e del 8%. La figura 13 c) è riferita, invece, alla BE che genera lo stesso picco base della cocaina e dell'ecgonina metilestere assieme due frammenti caratteristici a  $m/z$  240.2 (20%) e 361.3 (3%).

La figura 14 a) riguarda la morfina, la quale dà luogo principalmente ad un frammento ad  $m/z$  236.0 e a tre ioni a valori elevati di  $m/z$ :  $m/z$  429.2 (30% del picco base),  $m/z$  414.1 (15%) e  $m/z$  401.1 (10%). La figura 14 b) rappresenta lo spettro di massa EI-*full-scan* della codeina. I frammenti principali che si ritrovano nello spettro di massa sono:  $m/z$  371.2 (24% del picco base),  $m/z$  343.2 (9%),  $m/z$  313.2 (17%).

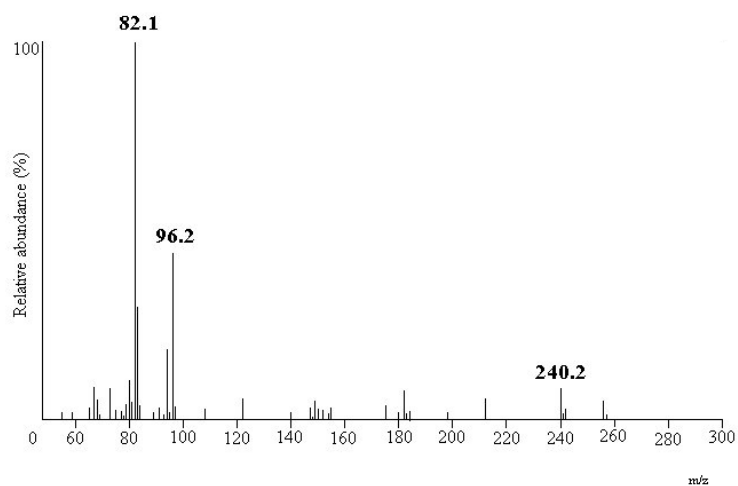
La figura 15 a) e 15 b) riporta gli spettri di massa EI-*full-scan*, rispettivamente, della nalorfina e della scopolamina: la prima dà luogo, come picco base, ad uno ione a  $m/z$  455.1, segue un picco a  $m/z$  440.1 (45%) e uno a  $m/z$  414.1 (80%); la seconda mostra un pattern di frammentazione caratterizzato dagli ioni ad  $m/z$  138.1 (picco base), 154.1 (32%) e 94.1 (68%).

**FIGURA 13.** SPETTRO DI MASSA *FULL-SCAN* DEI SILIL DERIVATI: PANNELLO A) COCAINA;  
PANNELLO B) ECGONINAMETILESTERE; PANNELLO C) BENZOINECGONINA

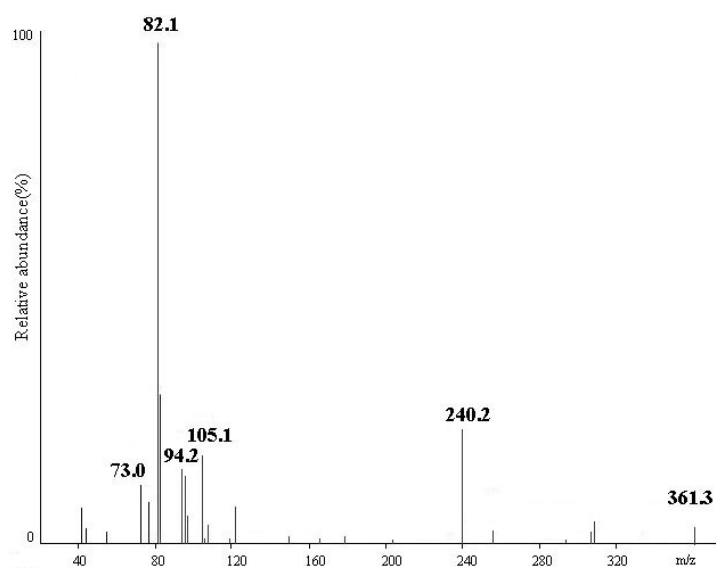
**A)**



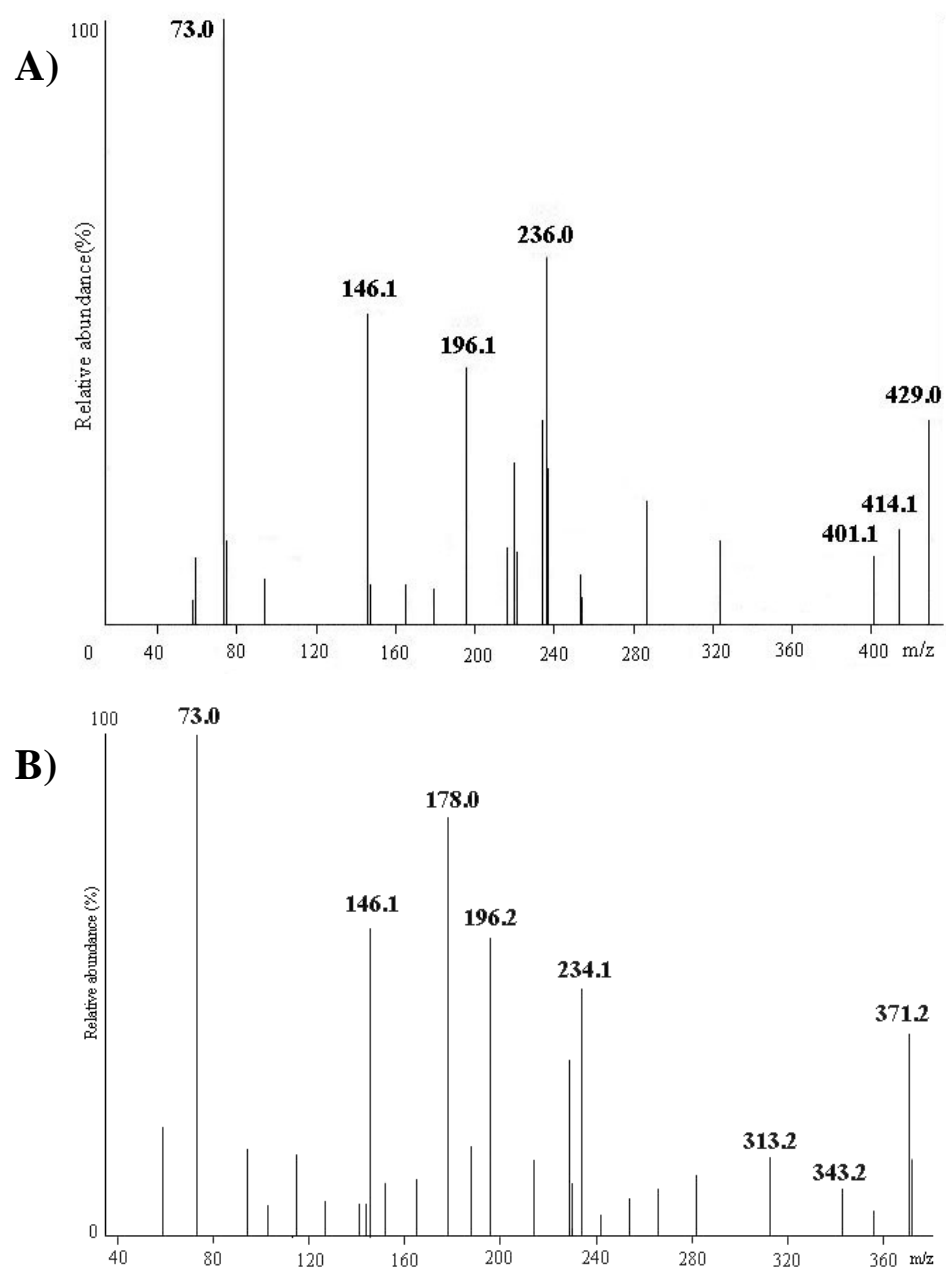
**B)**



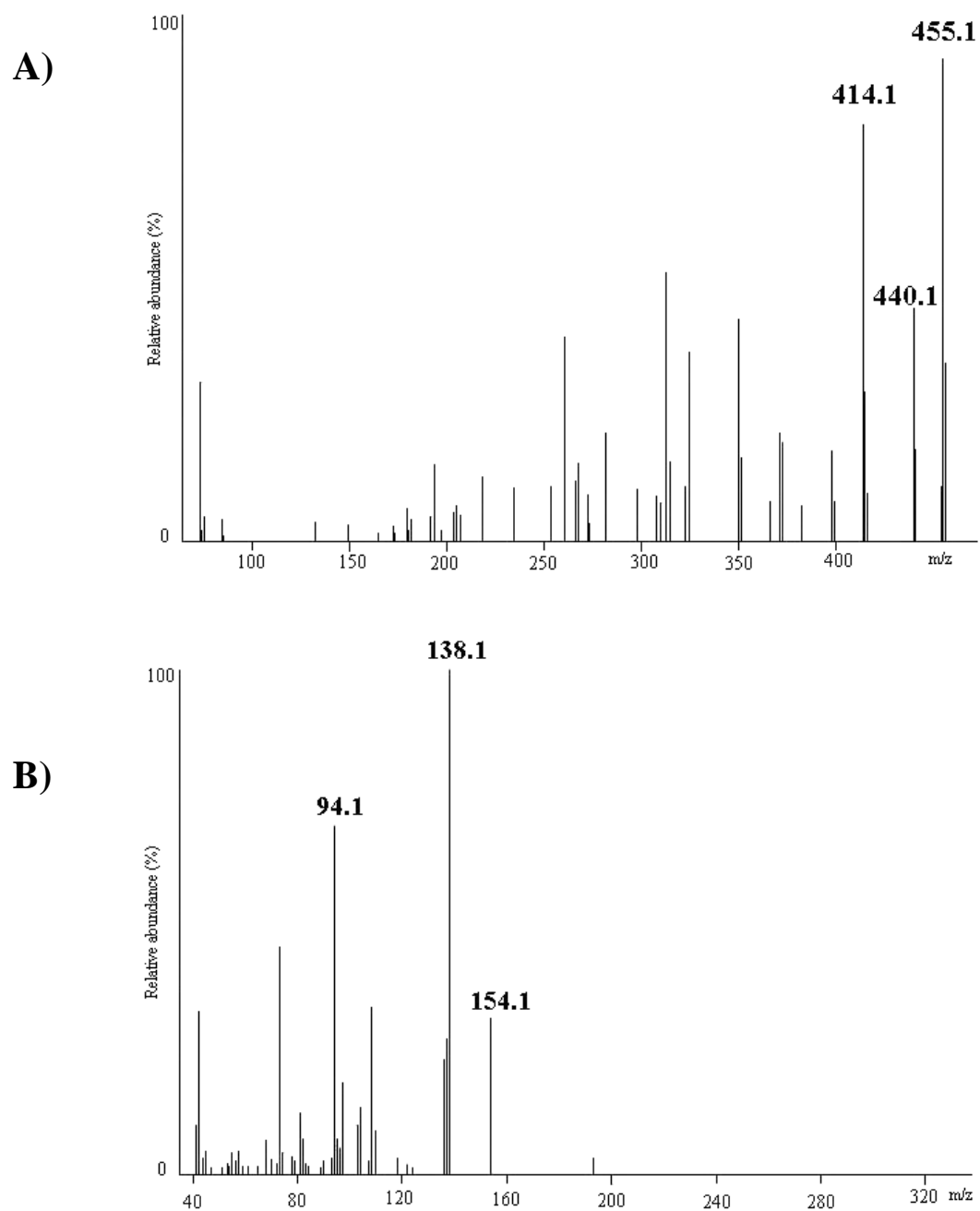
**C)**



**FIGURA 14.** SPETTRO DI MASSA *FULL-SCAN* DEI SILIL DERIVATI: PANNELLO A) MORFINA;  
PANNELLO B) CODEINA



**FIGURA 15.** SPETTRO DI MASSA *FULL-SCAN* DEI SILIL DERIVATI: PANNELLO A) NALORFINA;  
PANNELLO B) SCOPOLAMINA



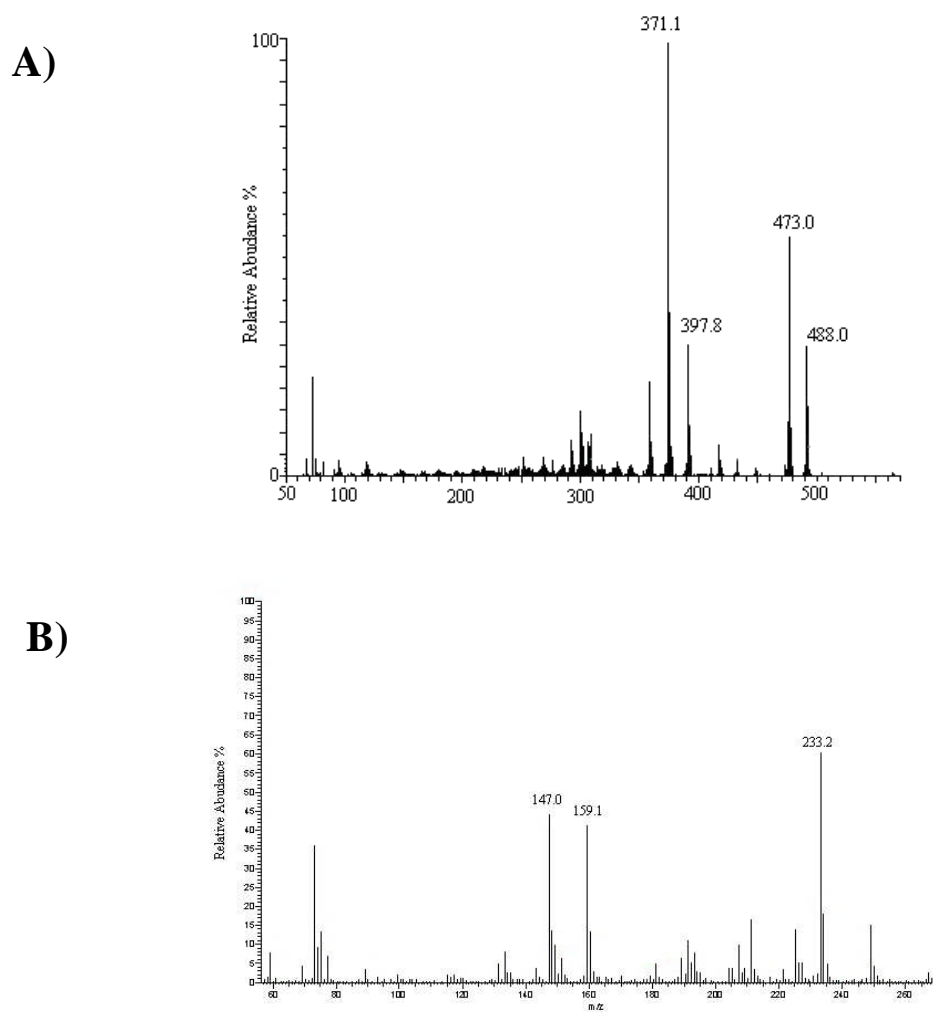
La figura 16, pannello a), rappresenta lo spettro di massa EI-*full-scan* dell'acido  $\Delta^9$ -idrocannabinolo. Lo spettro di massa mostra un frammento ionico con segnale a  $m/z$  371.1 che rappresenta il picco base con intensità relativa del 100%. Esso deriva dal picco molecolare per perdita di un radicale in seguito a frammentazione semplice. Il picco molecolare ha un segnale a valore di  $m/z$  488.0 con intensità relativa pari a 20%, mentre, il frammento ionico a  $m/z$  473.0 (intensità relativa pari al 60%) che si forma per perdita di un metile dal picco molecolare; il segnale a  $m/z$  397.8 in teoria si può formare dal picco molecolare per perdita di una parte dell'agente derivatizzante [M-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OH].

Lo spettro di massa GC/EI-MS *full-scan* (Fig. 16, pannello b) di una soluzione standard (20ng/ $\mu$ l) di GHB silanizzato mostra la presenza del picco molecolare con segnale a  $m/z$  248.0 da cui deriva, per perdita di un metile il segnale a valore di  $m/z$  233.1. Da questo frammento ionico, in seguito a fenomeni di frammentazione e di riarrangiamento in sorgente si formano i segnali a  $m/z$  159.0 e 147.0.

I risultati ottenuti sono del tutto analoghi ai risultati riportati in letteratura.



**FIGURA 16.** SPETTRO DI MASSA *FULL-SCAN* DEI SILIL DERIVATI: PANNELLO A) ACIDO DEL  $\Delta^9$ -TETRAIDROCANNABINOLO; PANNELLO B) ACIDO  $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO



### 6.3.2 SPETTRI DI MASSA EI-SIM

L'analisi quantitativa GC/MS di composti in miscele complesse viene effettuata acquisendo solo alcuni ioni selezionati, caratteristici delle sostanze in esame. La scelta degli ioni da selezionare si basa sulla necessità di rendere l'analisi quanto più specifica e sensibile. Generalmente è preferibile scegliere ioni a valori di  $m/z$  elevati, corrispondenti allo ione molecolare o, comunque, a frammenti contenenti gran parte della molecola. In tal modo si garantisce sufficiente specificità all'analisi; infatti, quanto maggiore è il valore di  $m/z$  considerato tanto minore è la probabilità che una eventuale impurezza, che casualmente eluisca allo stesso tempo di ritenzione dell'analita, presenti, all'interno del proprio spettro di massa, frammenti ionici a valori elevati di  $m/z$ . Questo è uno dei motivi per i quali nella scelta del derivatizzante solitamente si opta per quello che comporta il maggior incremento del peso molecolare della molecola<sup>25</sup>.

L'identificazione univoca degli analiti nei campioni incogniti, sebbene non siano analizzati mediante MS-EI-*full-scan* (che fornirebbe l'impronta digitale delle molecole) viene assicurata dalle altezze relative degli ioni selezionati. Infatti, una sostanza per essere univocamente identificata deve dar luogo ad uno spettro di massa SIM in cui le abbondanze relative tra gli ioni selezionati non varino in misura maggiore del 5% rispetto allo spettro di massa EI-*full-scan* della sostanza standard analizzata nelle medesime condizioni operative dello strumento.

Infine, per non perdere in sensibilità, vengono selezionati anche gli ioni che forniscono un maggior contributo alla corrente ionica totale relativa a ciascun analita, cioè quei segnali che, nello spettro di massa EI-*full-scan* presentano una maggior intensità relativa (ad esempio il picco base).

Gli ioni sono stati selezionati in base a quanto finora esposto. In tabella 6 sono riportati i tempi di ritenzione e i frammenti ionici selezionati per l'analisi SIM di ciascun analita.

**TABELLA 6:** TEMPI DI RITENZIONE E IONI SELEZIONATI NELL'ANALISI GCMS/EI-SIM RELATIVI ALLA COCAINA, MORFINA, LORO METABOLITI E STANDARD INTERNI

| SOSTANZA                 | T <sub>R</sub> | FRAMMENTI IONICI (m/z) |       |       |
|--------------------------|----------------|------------------------|-------|-------|
| <b>Cocaina</b>           | 9.23           | 82.2                   | 182.1 | 303.0 |
| <b>BE TMS</b>            | 9.76           | 82.1                   | 240.2 | 361.3 |
| <b>EME TMS</b>           | 4.53           | 82.1                   | 96.2  | 240.2 |
| <b>Scopolamina TMS</b>   | 10.36          | 138.1                  | 94.1  | 154.1 |
| <b>Codeina TMS</b>       | 11.18          | 371.2                  | 343.2 | 313.2 |
| <b>Morfina bis TMS</b>   | 11.59          | 429.2                  | 414.1 | 401.1 |
| <b>Nalorfina bis TMS</b> | 12.53          | 455.1                  | 414.1 | 440.1 |

Una miscela standard di analiti è stata analizzata mediante MS-EI-*full-scan* e MS-EI-SIM al fine di paragonare gli spettri di massa ottenuti e verificare che i rapporti fra le intensità relative degli ioni selezionati rientrassero nei limiti prefissati (dati non mostrati).

### 6.3.3 SPETTRI DI MASSA GC/ EI-MSMS

L'analisi MSMS prevede un primo stadio di analisi l'isolamento del frammento ionico più intenso, presente nello spettro di massa *full-scan*, in modo da selezionare la quasi totalità della corrente ionica generata dall'analita e non perdere in sensibilità e nel secondo stadio dell'analisi viene fornita energia supplementare, inducendo la frammentazione dello stesso. Gli ioni prodotto risultanti sono rivelati ed acquisiti nello spettro di massa tandem.

In primo luogo, lo scopo dell'analisi MSMS, del THCCOOH e del GHB, è stato quello di confermare le ipotesi di frammentazione in sorgente dei due analiti formulate nello spettro di massa *full-scan*. Inoltre, questo tipo di acquisizione ha consentito di mantenere i requisiti richiesti da un'analisi quantitativa in termini di specificità e sensibilità.

Per confermare quanto detto nel caso del THCCOOH è stato isolato e frammentato, con un energia supplementare di 0.8 V, il segnale corrispondente al frammento ionico a *m/z* 488.0. La scelta di tale frammento ionico è stata valutata dal fatto che esso rappresenta il valore di massa che comprende l'intera molecola in esame (picco molecolare). L'analisi effettuata ha

mostrato frammenti ionici a maggiore intensità relativa aventi segnali a valori di  $m/z$  371.1, 397.9 e 473.0, confermando che derivano tutti dal picco molecolare ( $m/z$  488.0).

Ulteriori indagini strutturali della molecola allo scopo di individuare l'origine degli altri segnali presenti nello spettro di massa possono essere effettuati mediante analisi in multistadio ( $MS^n$ ). Tuttavia, per scopi analitici, si è ritenuto sufficiente monitorare quest'unica transizioni indotta con modalità di acquisizione, mediante Registrazione di una Reazione Selezionata (Selected Reaction Monitoring, SRM), che ha consentito di aumentare ancora di più il rapporto segnale/rumore rispetto alla modalità MS-MS in cui si registra l'intero pattern di frammentazione.

Per quanto riguarda il GHB l'analisi GC/MSMS ha comportato l'isolamento e la frammentazione (con energia di frammentazione pari a 1 V) del segnale che corrisponde al frammento ionico al valore di  $m/z$  233 in quanto rappresenta in picco base dello spettro di massa *full-scan*. I risultati ottenuti hanno confermato che i frammenti ionici con segnali a valori di  $m/z$  159.0 e 147.0 derivano dal picco base. Anche in questo caso è stata scelta come modalità di acquisizione, necessaria per aumentare la sensibilità e specificità dell'analisi, la Registrazione di una Reazione Selezionata (Selected Reaction Monitoring, SRM).

Nella tabella 7 sono riportati i tempi di ritenzione e i frammenti ionici selezionati per l'analisi GC/EI/MSMS-SRM del THCCOOH e del GHB.

**TABELLA 7: TEMPI DI RITENZIONE E FRAMMENTI IONICI NELLE**

| ANALITA               | T <sub>R</sub> | MSMS-SRM ( $m/z$ ) |       |       |
|-----------------------|----------------|--------------------|-------|-------|
| GHB                   | 6.44           | 147.0              | 159.1 |       |
| GHBd <sub>6</sub>     | 7.44           | 153.0              | 165.1 |       |
| THCCOOH               | 13.60          | 371.1              | 398.0 | 473.0 |
| THCCOOHd <sub>3</sub> | 14.60          | 374.3              | 341.0 | 476.0 |

## 6.4 QUANTIFICAZIONE DEGLI ANALITI

### 6.4.1 LIMITI DI SENSIBILITÀ. LINEARITÀ DELLA RISPOSTA. COEFFICIENTI DI CORRELAZIONE

Il limite di rilievo (LOD) dell'analisi corrisponde alla minore quantità di analita che dà luogo ad un picco cromatografico la cui altezza risulta in rapporto 3:1 rispetto al rumore di fondo. I limiti di sensibilità relativi a ciascun analita si sono rivelati di gran lunga superiori ai limiti imposti dai valori di cut-off. Il limite di quantificazione (LOQ) è stato fissato come il valore corrispondente ad un rapporto segnale/rumore di fondo di 10:1 e varia a seconda del fattore di risposta dell'analita, risultando comunque entro i limiti imposti dai valori di cut-off (dati non mostrati).

La verifica della linearità di risposta nel range di concentrazione in esame è indispensabile al fine di accertarsi che la risposta fornita dall'analisi di un campione incognito è correlabile alla concentrazione dell'analita, calcolata adoperando una funzione lineare.

La linearità della risposta è stata verificata innanzitutto analizzando soluzioni standard degli analiti, utilizzando lo stesso range di concentrazioni adoperato successivamente per i campioni estratti dai capelli. Il range considerato comprende le concentrazioni di analita comunemente ritrovate nell'analisi di droghe estratte da capelli e urine di tossicodipendenti<sup>26</sup>.

Le rette di taratura ottenute sulle soluzioni standard mostrano una significativa linearità, confermata da coefficienti di correlazione molto prossimi a uno (dati non riportati).

I campioni utilizzati per la costruzione delle rette di taratura sono stati preparati aggiungendo, nel caso della matrice cheratinica, a capelli di soggetti non utilizzatori concentrazioni variabili dei sette analiti (0.375, 0.75, 1.5, 3, 6 ng/mg) e mantenendo costante la concentrazione degli standard interni (10 ng/mg). Per la matrice urinaria le rette di taratura costruite con campioni urinari di soggetti non assuntori preparati aggiungendo volumi costanti di soluzioni a concentrazione nota di COC, BE, EME, MOR e COD di 1200, 600, 300, 150 ng/ml; per il THCCOOH le concentrazioni sono state di 240, 120, 60, 30 ng/ml (50 ng/ml di standard interno); infine per il GHB le concentrazioni di soluzioni a titolo noto e variabile di 8, 4, 2, 1, 0.5 µg/ml e concentrazioni note e costanti di standard interno pari a 3 µg/ml.

I campioni sono stati trattati come descritto in precedenza e analizzati mediante GC/MS. Le rette sono state costruite riportando sull'asse delle ascisse le concentrazioni di ciascun analita e su quello delle ordinate il rapporto tra le aree dei picchi cromatografici relativi agli analiti e l'area del picco cromatografico del corrispondente standard interni.

#### 6.4.2 PRECISIONE E ACCURATEZZA

Per la valutazione della precisione ed accuratezza del metodo analitico sviluppato, sono state costruite tre rette di taratura, in giorni differenti, per ciascun analita, sia per la matrice urinaria sia per quella cheratinica (capelli e peli ascellari), adoperando ogni volta matrici di soggetti non assuntori diversi (I, II, III). Questa modalità di lavoro corrisponde ad una valutazione della precisione e dell'accuratezza analitica *inter-assay* e *inter-day*, nell'ambito delle determinazioni dei campioni reali processati con i campioni delle rette di taratura.

Per la costruzione di ciascuna retta di taratura sono stati preparati, estratti, derivatizzati e analizzati in GC/MSMS, cinque campioni a concentrazione crescente dei sette analiti in esame, ottenendo così 42 rette di totali, come mostrato in tabella 8.

**TABELLA 8.** EQUAZIONI DELLE RETTE DI TARATURA ADOPERATE PER LA VALUTAZIONE DELLA PRECISIONE E ACCURATEZZA DEI METODI SVILUPPATI

| GIORNI | EQUAZIONE RETTE<br>MATRICE CHERATININA | EQUAZIONE RETTE<br>MATRICE URINARIA   | ANALITA  |
|--------|--|---------------------------------------|--|
| I      | $y = 0,4722x - 0,0581; R^2 = 0,9997$   | $y = 0,0036x + 0,0542; R^2 = 0,9996$  | Cocaina  |
| II     | $y = 0,5211x - 0,0579; R^2 = 0,9997$   | $y = 0,027x - 0,0435; R^2 = 0,9998$   |  |
| III    | $y = 0,4833x - 0,0592; R^2 = 0,9999$   | $y = 0,015x + 0,0249; R^2 = 0,9989$   |  |
| I      | $y = 0,3504x - 0,1296; R^2 = 0,9992$   | $y = 0,004x + 0,0219; R^2 = 0,9959$   | Benzoil ecgonina                               |
| II     | $y = 0,4304x - 0,2296; R^2 = 0,9994$   | $y = 0,013x - 0,0301; R^2 = 0,9962$   |  |
| III    | $y = 0,5103x - 0,6201; R^2 = 0,9996$   | $y = 0,002x + 0,0219; R^2 = 0,9956$   |  |
| I      | $y = 0,2439x + 0,0429; R^2 = 0,9996$   | $y = 0,006x + 0,0095; R^2 = 0,9964$   | Ecgonina metilestere                           |
| II     | $y = 0,1243x + 0,0236; R^2 = 0,9992$   | $y = 0,008x + 0,0101; R^2 = 0,9923$   |  |
| III    | $y = 0,2339x + 0,0436; R^2 = 0,9998$   | $y = 0,005x + 0,0092; R^2 = 0,9966$   |  |
| I      | $y = 0,187x + 0,0383; R^2 = 0,9912$    | $y = 0,0092x + 0,0373; R^2 = 0,9996$  | Morfina  |
| II     | $y = 0,201x + 0,0376; R^2 = 0,9920$    | $y = 0,026x + 0,0786; R^2 = 0,9986$   |  |
| III    | $y = 0,224x + 0,0346; R^2 = 0,9937$    | $y = 0,053x + 0,0347; R^2 = 0,9992$   |  |
| I      | $y = 0,3937x + 0,0267; R^2 = 0,9855$   | $y = 0,00839x - 0,6134; R^2 = 0,9992$ | Codeina  |
| II     | $y = 0,3845x + 0,0248; R^2 = 0,9899$   | $y = 0,0748x - 0,6346; R^2 = 0,9995$  |  |
| III    | $y = 0,3776x + 0,0258; R^2 = 0,9901$   | $y = 0,0903x - 0,3146; R^2 = 0,9990$  |  |
| I      | $y = 0,3252x - 0,1054; R^2 = 0,9884$   | $y = 0,0015x + 0,0116; R^2 = 0,9901$  | Acido del $\Delta^9$ -tetra<br>idrocannabinolo |
| II     | $y = 0,3162x - 0,1154; R^2 = 0,9896$   | $y = 0,0010x - 0,0138; R^2 = 0,9987$  |  |
| III    | $y = 0,3352x - 0,1045; R^2 = 0,9889$   | $y = 0,0022x + 0,0240; R^2 = 0,9957$  |  |
| I      | $y = 0,3543x - 0,1258; R^2 = 0,9995$   | $y = 0,0182x + 0,0008; R^2 = 0,9985$  | Acido $\gamma$ -idrossibutirrico               |
| II     | $y = 0,3443x - 0,1267; R^2 = 0,9996$   | $y = 0,0210x + 0,010; R^2 = 0,9992$   |  |
| III    | $y = 0,3244x - 0,1332; R^2 = 0,9998$   | $y = 0,0176x + 0,0004; R^2 = 0,9989$  |  |

In base alle risposte analitiche ( $y = \text{area Analita} / \text{area Standard Interno}$ ), per ogni campione analizzato è stata calcolata la concentrazione di analita ( $x = [\text{Analita}]_i$ , dove  $i = \text{I, II, III}$ ) rispetto alla retta di taratura calcolata.

Sono stati quindi calcolati la media delle concentrazioni ottenute  $[\text{Analita}]_M$ , la deviazione standard, l'accuratezza percentuale e il coefficiente di variazione percentuale, secondo le seguenti formule:

$$[\text{Analita}]_M = \Sigma [\text{Analita}]_i / 3$$

$$\text{Acc.\%} = ([\text{Analita}]_M - [\text{Analita}]_{\text{nom}}) / [\text{Analita}]_{\text{nom}} \times 100$$

$$\text{CV\%} = \text{SD} / [\text{Analita}]_M \times 100$$

$[\text{Analita}]_{\text{nom}}$  = concentrazione nominale corrispondente alle effettive quantità di analita aggiunte ai campioni.

Nelle tabelle 9 e 10 sono mostrati i dati ottenuti relativi agli analiti, in matrice pilifera e in matrice urinaria.

**TABELLA 9.** PRECISIONE E ACCURATEZZA DEL METODO ANALITICO ADOPERATO PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANALITI IN MATRICE PILIFERA

| <b>[COC]<sub>nom</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[COC]<sub>I</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[COC]<sub>II</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[COC]<sub>III</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[COC]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mg</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 6                                    | 6.14                               | 6.56                                | 4.69                                 | 5.79± 0.9                               | -3.39        | 16.90      |
| 3                                    | 2.75                               | 3.01                                | 3.55                                 | 3.10±0.41                               | 3.44         | 13.15      |
| 1.5                                  | 1.49                               | 1.58                                | 1.49                                 | 1.52±0.05                               | 1.33         | 3.42       |
| 0.75                                 | 1.09                               | 0.7                                 | 0.82                                 | 0.87±0.11                               | 16.00        | 22.95      |
| 0.375                                | 0.36                               | 0.45                                | 0.39                                 | 0.40±0.05                               | 6.66         | 11.45      |

| <b>[BE]<sub>nom</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[BE]<sub>I</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[BE]<sub>II</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[BE]<sub>III</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[BE]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mg</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|------------|
| 6                                   | 6.05                              | 6.25                               | 4.89                                | 5.73± 0.73                             | -4.50        | 12.82      |
| 3                                   | 2.91                              | 2.94                               | 3.59                                | 3.14±0.38                              | 4.88         | 12.22      |
| 1.5                                 | 1.45                              | 1.63                               | 1.39                                | 1.49±0.12                              | -0.66        | 8.38       |
| 0.75                                | 0.78                              | 0.69                               | 0.71                                | 0.73±0.05                              | -3.11        | 6.50       |
| 0.375                               | 0.42                              | 0.34                               | 0.38                                | 0.38±0.04                              | 1.33         | 10.53      |

| <b>[EME]<sub>nom</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[EME]<sub>I</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[EME]<sub>II</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[EME]<sub>III</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[EME]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mg</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 6                                    | 5.82                               | 5.28                                | 6.84                                 | 5.98± 0.79                              | -0.33        | 13.24      |
| 3                                    | 3.23                               | 2.68                                | 3.98                                 | 3.30±0.65                               | 9.88         | 19.79      |
| 1.5                                  | 1.51                               | 1.21                                | 1.46                                 | 1.39±0.16                               | -7.11        | 11.53      |
| 0.75                                 | 0.77                               | 1.02                                | 0.79                                 | 0.86±0.14                               | 14.66        | 16.15      |
| 0.375                                | 0.29                               | 0.39                                | 0.38                                 | 0.35±0.06                               | -5.78        | 15.58      |

| <b>[MOR]<sub>nom</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[MOR]<sub>I</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[MOR]<sub>II</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[MOR]<sub>III</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[MOR]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mg</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 6                                    | 5.84                               | 5.96                                | 7.28                                 | 6.36± 0.79                              | 6.00         | 12.56      |
| 3                                    | 3.38                               | 2.99                                | 3.48                                 | 3.28±0.26                               | 9.44         | 7.88       |
| 1.5                                  | 1.45                               | 1.58                                | 2.07                                 | 1.70±0.33                               | 13.34        | 19.23      |
| 0.75                                 | 0.75                               | 0.76                                | 0.84                                 | 0.78±0.05                               | 4.44         | 6.29       |
| 0.375                                | 0.3                                | 0.47                                | 0.38                                 | 0.38±0.086                              | 2.22         | 22.16      |



| <b>[COD]<sub>nom</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[COD]<sub>I</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[COD]<sub>II</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[COD]<sub>III</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[COD]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mg</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 6                                    | 5.80                               | 6.25                                | 6.68                                 | 6.24± 0.44                              | 4.06         | 7.05       |
| 3                                    | 3.49                               | 3.08                                | 3.48                                 | 3.35±0.23                               | 11.67        | 6.98       |
| 1.5                                  | 1.41                               | 1.59                                | 1.59                                 | 1.53±0.10                               | 2.00         | 6.79       |
| 0.75                                 | 0.62                               | 0.59                                | 0.77                                 | 0.66±0.09                               | -12.00       | 14.61      |
| 0.375                                | 0.31                               | 0.38                                | 0.32                                 | 0.34±0.04                               | -10.22       | 11.24      |

| <b>[THCOOH]<sub>nom</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[THCOOH]<sub>I</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[THCOOH]<sub>II</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[THCOOH]<sub>III</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[THCOOH]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mg</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|---|---------------------------------------|--|---|--|--------------|------------|
| 6                                       | 6.10                                  | 5.68                                   | 6.38                                    | 6.05± 0.35                                 | 0.89         | 5.82       |
| 3                                       | 2.75                                  | 2.98                                   | 3.58                                    | 3.10±0.43                                  | 3.44         | 13.80      |
| 1.5                                     | 1.27                                  | 1.15                                   | 1.55                                    | 1.32±0.20                                  | -11.78       | 15.51      |
| 0.75                                    | 1.09                                  | 0.69                                   | 0.77                                    | 0.85±0.21                                  | 13.33        | 24.90      |
| 0.375                                   | 0.36                                  | 0.28                                   | 0.39                                    | 0.34±0.06                                  | -8.44        | 16.56      |

| <b>[GHB]<sub>nom</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[GHB]<sub>I</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[GHB]<sub>II</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[GHB]<sub>III</sub><br/>ng/mg</b> | <b>[GHB]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mg</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 6                                    | 6.03                               | 5.69                                | 6.24                                 | 5.99± 0.38                              | -0.22        | 4.64       |
| 3                                    | 2.92                               | 2.99                                | 3.59                                 | 3.16±0.37                               | 5.56         | 11.63      |
| 1.5                                  | 1.54                               | 1.28                                | 1.78                                 | 1.53±0.25                               | 2.22         | 16.31      |
| 0.75                                 | 0.72                               | 0.9                                 | 0.71                                 | 0.78±0.11                               | 3.56         | 13.77      |
| 0.375                                | 0.41                               | 0.42                                | 0.38                                 | 0.40±0.02                               | 7.56         | 5.16       |

**TABELLA 10.** PRECISIONE E ACCURATEZZA DEL METODO ANALITICO ADOPERATO PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANALITI IN MATRICE URINARIA

| <b>[COC]<sub>nom</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[COC]<sub>I</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[COC]<sub>II</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[COC]<sub>III</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[COC]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mL</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 1200                                 | 1192.8                             | 1187.9                              | 1450.8                               | 1277.2± 150.40                          | 6.43         | 11.78      |
| 600                                  | 587.2                              | 640.3                               | 586.9                                | 604.8±30.7                              | 0.80         | 5.08       |
| 300                                  | 312.3                              | 376.1                               | 268.3                                | 318.9±54.2                              | 6.30         | 16.99      |
| 150                                  | 145.6                              | 130.3                               | 156.9                                | 144.3±13.4                              | -3.82        | 9.25       |
| 75                                   | 70.6                               | 82.3                                | 78.3                                 | 77.1±5.9                                | 2.76         | 7.72       |

| <b>[BE]<sub>nom</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[BE]<sub>I</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[BE]<sub>II</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[BE]<sub>III</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[BE]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mL</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|------------|
| 1200                                | 1190.4                            | 1187.9                             | 1560.5                              | 1312.93± 214.40                        | 9.41         | 16.33      |
| 600                                 | 655.5                             | 710.3                              | 616.9                               | 660.9±46.93                            | 10.15        | 7.10       |
| 300                                 | 305.5                             | 250.1                              | 315.2                               | 290.3±35.12                            | -3.24        | 12.10      |
| 150                                 | 128.7                             | 129.3                              | 140.2                               | 132.70±6.47                            | -11.52       | 4.88       |
| 75                                  | 68.9                              | 86.7                               | 69.9                                | 75.17±10.00                            | 0.22         | 13.30      |

| <b>[EME]<sub>nom</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[EME]<sub>I</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[EME]<sub>II</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[EME]<sub>III</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[EME]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mL</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 1200                                 | 1217.50                            | 1186.9                              | 1222.8                               | 1209.07± 19.38                          | 0.76         | 1.60       |
| 600                                  | 544.2                              | 501.3                               | 601.9                                | 549.16±50.48                            | -8.48        | 9.19       |
| 300                                  | 254.2                              | 299.1                               | 310.3                                | 287.87±29.69                            | -4.04        | 10.31      |
| 150                                  | 134.5                              | 135.2                               | 123.2                                | 130.976±6.74                            | -12.69       | 5.14       |
| 75                                   | 70.8                               | 74.9                                | 67.3                                 | 71.0±3.80                               | -5.33        | 5.35       |

| <b>[MOR]<sub>nom</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[MOR]<sub>I</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[MOR]<sub>II</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[MOR]<sub>III</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[MOR]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mL</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 1200                                 | 1193.30                            | 1353.2                              | 1212.8                               | 1253.10± 87.24                          | 4.43         | 6.96       |
| 600                                  | 604.2                              | 589.9                               | 660.3                                | 618.13±37.21                            | 3.02         | 6.02       |
| 300                                  | 284                                | 298.6                               | 354.3                                | 312.30±37.09                            | 4.10         | 11.88      |
| 150                                  | 152.6                              | 165.6                               | 178.9                                | 165.70±13.15                            | 10.47        | 7.93       |
| 75                                   | 79.3                               | 56.3                                | 90.2                                 | 75.26±17.30                             | 0.36         | 23.00      |

| <b>[COD]<sub>nom</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[COD]<sub>I</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[COD]<sub>II</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[COD]<sub>III</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[COD]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mL</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 1200                                 | 1202.50                            | 1002.9                              | 1250.8                               | 1152.73± 131.39                         | -3.99        | 11.41      |
| 600                                  | 593.4                              | 708.3                               | 522.2                                | 607.97±93.90                            | 1.33         | 15.45      |
| 300                                  | 307.4                              | 298.6                               | 301.6                                | 302.87±4.10                             | 0.843        | 1.48       |
| 150                                  | 117.4                              | 155.6                               | 155.9                                | 142.30±22.60                            | -4.69        | 15.49      |
| 75                                   | 74.6                               | 69.3                                | 86.2                                 | 76.70±8.64                              | 2.27         | 11.27      |

| <b>[THCOOH]<sub>nom</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[THCOOH]<sub>I</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[THCOOH]<sub>II</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[THCOOH]<sub>III</sub><br/>ng/mL</b> | <b>[THCOOH]<sub>M</sub> ± SD<br/>ng/mL</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|---|---------------------------------------|--|---|--|--------------|------------|
| 240                                     | 234.40                                | 225.2                                  | 248.2                                   | 235.93±11.58                               | -1.69        | 14.91      |
| 120                                     | 109.5                                 | 136.9                                  | 120.3                                   | 122.23±13.80                               | 1.86         | 12.29      |
| 60                                      | 74.5                                  | 60.6                                   | 71.2                                    | 68.77±7.26                                 | 14.61        | 11.56      |
| 30                                      | 31.3                                  | 26.4                                   | 35.2                                    | 30.97±4.41                                 | 3.22         | 10.24      |
| 15                                      | 12.3                                  | 15.9                                   | 12.1                                    | 13.43±2.14                                 | -10.44       | 9.92       |

| <b>[GHB]<sub>nom</sub><br/>µg/mL</b> | <b>[GHB]<sub>I</sub><br/>µg/mL</b> | <b>[GHB]<sub>II</sub><br/>µg/mL</b> | <b>[GHB]<sub>III</sub><br/>µg/mL</b> | <b>[GHB]<sub>M</sub> ± SD<br/>µg/mL</b> | <b>Acc.%</b> | <b>CV%</b> |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|------------|
| 8                                    | 8.11                               | 7.01                                | 8.96                                 | 8.03±0.98                               | 0.33         | 12.18      |
| 4                                    | 4.11                               | 3.65                                | 4.68                                 | 4.15±0.52                               | 3.67         | 12.44      |
| 2                                    | 1.99                               | 2.45                                | 1.99                                 | 2.14±0.20                               | 7.17         | 12.30      |
| 1                                    | 1.28                               | 1.08                                | 0.96                                 | 1.11±0.16                               | 10.67        | 14.61      |
| 0.5                                  | 0.49                               | 0.69                                | 0.54                                 | 0.57±0.10                               | 14.67        | 18.15      |

La deviazione standard dipende dalla dispersione delle misure effettuate rispetto al valore medio ed è un indice connesso principalmente con l'errore statistico. Pertanto, non dovrebbe dipendere strettamente dalla concentrazione dell'analita in esame ma essenzialmente dagli errori, di entità variabile e casuali, che si commettono durante le varie fasi della procedura analitica adoperata nella quantificazione.

Le possibili fonti di errore possono avvenire durante: a) la preparazione dei campioni a titolo noto necessari a costruire la retta di taratura e pesata della sostanza liofilizzata, volume impiegato per sciogliere il campione e successive diluizioni; b) l'estrazione degli analiti mediante le colonnine impaccate con fasi stazionarie differenti a seconda degli analiti, cioè:

errori nei volumi e nei flussi di eluizione, perdita di campione nel portare a secco la soluzione eluente ecc; c) la rivelazione degli analiti, in relazione alle fluttuazioni dei parametri operativi della strumentazione analitica adoperata, come ad esempio, nel caso di uno spettrometro di massa, una variazione nell'efficienza di ionizzazione o nella trasmissione degli ioni dalla sorgente all'analizzatore; d) la quantificazione degli analiti, cioè l'integrazione dei picchi cromatografici.

Le deviazioni standard riportate in Tabella 8 riferite alle rette di taratura degli analiti in matrice urinaria variano in range molto ampi (2-224), dovuti ai lunghi periodi di tempo intercorsi tra una retta e l'altra che ha comportato notevoli differenze delle condizioni operative. I valori di deviazione standard determinati nel caso del GHB urinario, invece, sono in range leggermente più ristretti (0,1-0,9). Ciò è deputabile sia alla tecnica di estrazione adoperata (liquido-liquido) che comporta un minor numero di step durante la procedura di lavoro, sia ai tempi intercorsi tra la costruzione di una retta rispetto all'altra che sono risultati essere brevi (le tre rette sono state costruite in tre giorni consecutivi). Questa modalità di lavoro eseguita in questo caso si è basata sul fatto che nell'ambito del progetto di dottorato, non è stato previsto l'analisi di campioni incogniti in quanto in Italia tale sostanza non è ancora diffusa come droga di abuso. La deviazione standard, quindi, in questo caso, varia in un ristretto range di valori, denotando la riproducibilità dell'analisi.

Per quanto riguarda gli altri analiti, gli ampi range delle deviazioni standard, per entrambe le matrici complesse, evidenziano l'importanza della costruzione di una retta di calibrazione ogni qual volta si presenta la necessità di quantificare la sostanza stupefacente nelle urine e/o nei capelli di un soggetto assuntore di droga, allo scopo garantire l'attendibilità della risposta analitica.

La deviazione standard è un indice di dispersione indipendente dalle concentrazioni nominali dell'analita e pertanto, non deve variare significativamente al variare delle concentrazioni; al contrario il coefficiente di variazione ( $CV = SD/X_M$ , dove  $X_M$  = media delle concentrazioni degli analiti calcolate attraverso misure ripetute) in linea teorica, deve progressivamente diminuire al crescere delle concentrazioni. Dalle tabelle 5 e 6 si evidenzia che tale andamento non è garantito, tuttavia, quasi tutti i livelli di concentrazione indagati hanno presentato valori del CV inferiori al 15% anche alla più bassa concentrazione presa in esame, rispondendo ai requisiti richiesti una della validazione della metodica analitica.

Coefficiente di variazione e deviazione standard forniscono il grado di precisione dell'analisi, dando, quindi, un'idea di quanto l'analisi risulti riproducibile; mentre l'affidabilità del metodo si valuta calcolando l'accuratezza percentuale, che indica il discostamento del

valore medio fornito dall'analisi rispetto al valore reale (cioè rispetto alla concentrazione nominale dell'analita) rapportato alla concentrazione nominale stessa. Anche in questo caso, quindi, il valore dell'accuratezza dovrebbe decrescere al crescere delle concentrazioni.

I risultati ottenuti, nel caso dei campioni per la retta di taratura (tabelle 7 e 8), pur presentando una leggera fluttuazione e non sempre per entrambe le matrici complesse riflettono un andamento decrescente, risultano inferiori al 15%.

La metodologia analitica finora descritta presenta, quindi, i requisiti di riproducibilità ed affidabilità necessari per la rivelazione e la quantificazione di droghe in campioni incogniti di soggetti presumibilmente dediti all'uso di stupefacenti.

## **6.5 DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE STUPEFACENTI IN SOGGETTI DEDITI ALL'ABUSO DI DROGHE**

La necessità di verificare l'assunzione di sostanze stupefacenti da parte di un soggetto è legata principalmente alle percentuali molto alte di casi di incidenti stradali registrate negli ultimi anni, agli abusi sessuali di donne che inconsapevolmente hanno assunto una sostanza stupefacente, ai casi legali di custodia dei figli, alle adozioni, alle pratiche di separazione e di divorzio. Inoltre, le metodiche analitiche descritte rappresentano un valido sistema per monitorare categorie a rischio, il cui lavoro implica elevata responsabilità nei confronti della collettività, come ad es. piloti o autisti di mezzi pubblici per dimostrare la responsabilità di individui colpevoli di aver causato gravi incidenti stradali<sup>4</sup>.

Il range considerato nel lavoro finora descritto fa riferimento ai valori di cut-off analitico (che forniscono il limite inferiore alla risposta del dato quantitativo) e ai valori più frequentemente ritrovati nell'analisi di campioni reali (limite superiore).

I campioni reali sono stati processati allo stesso modo delle soluzioni in matrice preparate per la costruzione delle rette di calibrazione e la quantità di analita nei campioni reali è stata calcolata inserendo i valori misurati dei rapporti tra le aree dei picchi cromatografici, rispettivamente, dell'analita e dello standard interno nell'equazione della curva di calibrazione: il valore di concentrazione dell'analita nel campione incognito è dato dal valore della  $x$  nell'equazione.

In tabella 11 sono mostrati i valori di concentrazione degli analiti ritrovati nelle urine di soggetti dediti all'aduso di stonzanze stupefacenti. Per ciascun campione il soggetto in esame ha compilato e firmato il consenso informato necessario per il prelievo della matrice da analizzare. Nel caso dei campioni pervenuti in laboratorio il prelievo dell'urina è stato effettuato nella sede della ditta richiedente e il campione è giunto in laboratorio entro le 12 ore con il consenso informato firmato dall'interessato. Le analisi GC/MS dei campioni, cui sono stati aggiunti 50 µl della soluzione di standard interno, sono state condotte nelle medesime condizioni descritte per i campioni adoperati per la costruzione delle rette di calibrazione.

**TABELLA 11.** LIVELLI DI CONCENTRAZIONI RITROVATE NELLE URINE DI CAMPIONI INCOGNITI

| N. SOGGETTO INDAGATO | CONC. URINE<br>ng/mL |        |        |         |        |
|----------------------|----------------------|--------|--------|---------|--------|
| 1                    | COC                  |        | BE     |         | EME    |
|                      | 15.84                |        | 1473.7 |         | 1283.3 |
| 2                    | COC                  | BE     | EME    | MOR     | COD    |
|                      | 328.9                | 3572.4 | 288.6  | 12166.3 | 91.6   |
| 3                    | COC                  |        | BE     |         | EME    |
|                      | 3750                 |        | 2843.6 |         | 2256.6 |
| 4                    | THCCOOH              |        |        |         |        |
|                      | 21.0                 |        |        |         |        |
| 5                    | THCCOOH              |        |        |         |        |
|                      | 74.20                |        |        |         |        |
| 6                    | COC                  |        | BE     |         | EME    |
|                      | 226.3                |        | 270.2  |         | 511.3  |

Come mostra la tabella 11, il soggetto 1 presenta livelli di cocaina nelle urine (15.84 ng/ml) nettamente inferiori ai livelli di cut-off (150 ng/ml), mentre i valori di benzoilecgonina (BE) e di ecgoninametilestere (EME) risultano essere, rispettivamente, 90 e 85 volte maggiori

rispetto a quelli della cocaina. Gli elevati livelli di concentrazione di BE e di EME (rispettivamente di 1473.7, 1283.3 ng/ml) ritrovati lasciano supporre che il risultato analitico risulta essere senza dubbio positivo, tanto da poter dire con assoluta certezza che c'è stata un'effettiva assunzione diretta di droga da parte del soggetto 1, in quanto le notevoli quantità di metaboliti ritrovate concordano con le diverse percentuali escete nelle urine (49% di BE e 45% di EME) rispetto all'escrezione della cocaina (10%), inoltre, concorda con l'emivita degli analiti che risulta essere maggiore per i metaboliti rispetto a quella della cocaina e ciò significa che il soggetto ha assunto cocaina almeno 7 ore prima del campionamento urinario con assunzioni multiple.

Anche per il soggetto 2 gli elevati livelli di concentrazione di BE e di EME determinano l'avvenuta assunzione volontaria di droga da parte del soggetto. Inoltre in questo caso il campione urinario contiene basse quantità di codeina rilevabili mediante la metodologia proposta; tuttavia presenza della morfina consente di stabilire con certezza l'effettiva assunzione di stupefacenti. Infatti, l'eroina, una volta assunta, viene in parte metabolizzata a morfina e 6-monoacetilmorfina, la cui presenza all'interno delle matrici, quindi, definisce inequivocabilmente l'avvenuta assunzione. La codeina, invece, si ritrova solitamente nei soggetti dediti all'uso di "droghe" in quanto rappresenta un'impurezza presente nelle dosi di eroina comunemente smerciate nei mercati illeciti; di conseguenza l'assenza o le basse quantità ritrovate di codeina potrebbero derivare semplicemente dal consumo di eroina particolarmente pura o comunque priva di codeina quale impurezza principale.

L'analisi GC/MSMS del campione 4 e 5 ha fornito esito positivo. Nel caso del campione 4 la concentrazione di THCCOOH, sebbene presente in basse quantità, risulta comunque al di sopra del valore di cut-off analitico (15 ng/mL).

## Capelli

La tabella 12 mostra i valori di concentrazione in matrice pilifera. Anche in questo caso ciascun soggetto ha compilato e firmato il consenso informato per l'autorizzazione a prelevare la matrice in oggetto. Le analisi GC/MS dei campioni, cui sono stati aggiunti 50 µl della soluzione di standard interno, sono state condotte nelle medesime condizioni descritte per i campioni adoperati per la costruzione delle rette di calibrazione.

**TABELLA 12.** LIVELLI DI CONCENTRAZIONI RITROVATE NEI CAPELLI  
DI CAMPIONI INCOGNITI

| N. SOGGETTO INDAGATO | CONC. CAPELLI/PELI<br>mg/mg |      |       |       |       |
|----------------------|-----------------------------|------|-------|-------|-------|
|                      | COC                         |      | BE    |       | EME   |
| 1                    | 0.020                       |      | 0.098 |       | 0.239 |
|                      |                             |      |       |       |       |
| 2                    | 8.22                        |      | 4.96  |       | 1.86  |
|                      |                             |      |       |       |       |
| 3                    | 4.27                        |      | 0.63  |       | 0.72  |
|                      |                             |      |       |       |       |
| 4                    | 64.76                       |      | 6.69  |       | 7.68  |
|                      |                             |      |       |       |       |
| 5                    | 0.19                        |      | 0.57  |       | 0.36  |
|                      |                             |      |       |       |       |
| 6                    | 3.34                        |      | 1.57  |       | 2.51  |
|                      |                             |      |       |       |       |
| 7                    | COC                         | BE   | EME   | MOR   | COD   |
|                      | 0.13                        | 0.34 | 0.18  | 0.299 | 0.026 |
| 8                    | THCCOOH                     |      |       |       |       |
|                      | 7.69                        |      |       |       |       |
| 9                    | THCCOOH                     |      |       |       |       |
|                      | 25.8                        |      |       |       |       |



Solo l'analisi GC/MS del campione 1 ha avuto esito negativo per la determinazione della cocaina e dei suoi metaboliti, infatti, i valori di concentrazione degli analiti risultano essere inferiori al cut-off analitico (0.5 ng/mg).

In tutti i restanti casi le concentrazioni di cocaina sono risultate essere sempre elevate.

Per quanto riguarda la positività accertata nei campioni sottoposti all'analisi per l'individuazione e quantificazione del THCCOH in matrice cheratinica è indice di assunzione ripetuta nel tempo

## DISCUSSIONE

La diffusione del fenomeno dell'abuso di sostanze stupefacenti ha suscitato l'interesse internazionale al fine di contenere il fenomeno stesso. Furono per primi gli U.S.A. a promulgare una legge federale conosciuta con il nome di "Harrison Act" (1914) volta a regolamentare il commercio ed il consumo dei farmaci derivanti dall'oppio e di ogni derivato naturale o sintetico con proprietà narcotiche simili a quelle della morfina. Da allora molti altri governi hanno affrontato il problema e negli anni si sono succeduti atti, trattati e convenzioni internazionali tesi al controllo della produzione e circolazione di alcune droghe; tra questi riveste notevole importanza una Convenzione delle Nazioni Unite redatta nel 1988 cui ha aderito anche l'Italia.

Volendo, poi, restringere l'attenzione nell'ambito nazionale, la normativa in tema di stupefacenti è raccolta nel Testo Unico (D.P.R. n 309/90) di cui alcuni articoli hanno subito parziale o totale abrogazione referendaria. La normativa attualmente in vigore tiene in considerazione tutte le sfaccettature della problematica, dall'aspetto sanzionatorio riguardante la produzione e il traffico illecito di sostanze stupefacenti (art.73) alla questione della terapia volontaria (art.120). L'art. 78, in particolare, è dedicato alla quantificazione delle sostanze tossiche e delega il Ministero della Sanità a promulgare specifici decreti -aggiornati periodicamente in relazione all'evoluzione delle conoscenze nel settore- che indichino adeguate procedure diagnostiche e medico-legali da adoperare per accertare l'uso abituale di sostanze stupefacenti o psicotrope. Gli organi giudiziari tendono ad avvalersi delle più moderne ed efficaci tecniche analitiche, capaci di garantire un elevato grado di accuratezza ed univocità di identificazione; tuttavia i Decreti Ministeriali emanati finora non indicano specificamente quale tecnica analitica adottare per l'accertamento dell'uso individuale di sostanze stupefacenti.

Tenendo conto di quanto suddetto, il fine principale di questo lavoro di tesi di dottorato è stato quello di trovare le metodiche quanto più sensibili e specifiche da adoperare come procedure standard per l'individuazione di sostanze stupefacenti oppure dei loro metaboliti nelle matrici biologiche. Il lavoro, inoltre ha tenuto conto della recente introduzione nel mercato illecito italiano delle nuove sostanze stupefacenti.

Tale ricerca si è focalizzata soprattutto sul confronto tra diversi metodi di derivatizzazione degli analiti e sulla comparazione di differenti tecniche di introduzione e di acquisizione connesse con l'analisi mediante GC/MS.

### *Derivatizzazione degli analiti*

I derivatizzanti più comunemente adoperati nell'ambito dell'analisi degli stupefacenti mediante gas cromatografia sono i sililanti, che fungono, allo stesso tempo, da agente derivatizzante e da solvente del campione, il quale viene introdotto direttamente nella colonna cromatografica senza previo allontanamento del derivatizzante in eccesso. Ciò comporta notevoli difficoltà pratiche in quanto l'interazione dell'agente sililante con la fase stazionaria della colonna provoca la degradazione della fase stazionaria stessa causando non solo una notevole riduzione dell'efficienza risolutiva dell'analisi cromatografica, ma anche un vero e proprio consumo della colonna capillare. La presenza del sililante, inoltre, costringe l'operatore a frequenti operazioni di manutenzione dello strumento, comportando notevole dispendio di tempo, sia nel caso si adoperi la tecnica di iniezione *splitless* sia in *on-column*. Infine, poichè gli agenti sililanti risentono dell'umidità presente nell'ambiente, è necessario porre particolare attenzione alla conservazione dei campioni.

Per ovviare, quindi, agli inconvenienti provocati dall'utilizzo del BSTFA come solvente degli analiti, dopo la reazione di derivatizzazione si è proceduto all'eliminazione dell'agente sililante trattando il campione con una miscela di diclorometano e acqua. I sililderivati si ripartiscono nella fase organica, mentre l'acqua reagendo con il BSTFA consente la completa eliminazione dal diclorometano dell'agente sililante in eccesso. In tal modo gli analiti, sciolti in diclorometano, possono essere introdotti in colonna.

Sono però da sottolineare i fattori che rendono poco agevole l'uso di questa procedura, quali i lunghi tempi di analisi -dovuti proprio alla fase di purificazione- e la parziale perdita di campione che si potrebbe verificare durante il processo di estrazione del derivatizzante.

Quanto detto finora ha suggerito la necessità di ricercare un derivatizzante che espliciti le stesse funzioni del BSTFA (rendere volatili gli analiti; formare composti a maggiore peso molecolare) senza altresì comportarne gli stessi svantaggi. A tale scopo è stata adoperata l'anidride eptafluorobutirrica che danno luogo a eptafluorobutirrilderivati.

L'anidride eptafluorobutirrica ha consentito di superare tutti gli svantaggi connessi con l'utilizzo del BSTFA, in quanto non si verificano reazioni secondarie e si ottengono campioni privi di impurezze. Infatti, l'HFBA è disponibile in commercio quale composto pressoché puro; inoltre, la presenza degli atomi di fluoro rende la molecola maggiormente reattiva, evitando di dover adoperare la piridina quale catalizzatore. Accanto a tutti questi vantaggi è da sottolineare anche il notevole incremento di massa che si ottiene aggiungendo agli analiti gruppi contenenti ben sette atomi di fluoro. Un elevato incremento del peso molecolare contribuisce a migliorare la specificità dell'analisi quantitativa, perché quanto maggiore è il valore del rapporto massa/carica considerato tanto minore è l'eventualità che una impurezza, che casualmente eluisca allo stesso tempo di ritenzione dell'analita in esame, presenti, all'interno del proprio spettro di massa, frammenti ionici a valori elevati di  $m/z$ .

Tuttavia, la derivatizzazione con HFBA non ha consentito di ottenere i medesimi risultati per tutti gli analiti presi in esame e, di conseguenza, per effettuare una reazione simultanea è stato scelto come agente derivatizzante opportuno il BSTFA.

Una volta scelto il derivatizzante, si è passati all'ottimizzazione della tecnica strumentale, in termini di sensibilità e specificità del metodo di rivelazione adoperato.

#### *Ottimizzazione del metodo di rivelazione*

La spettrometria di massa consente l'identificazione delle sostanze mediante l'acquisizione del relativo spettro di massa in un ampio intervallo di  $m/z$  (*full-scan*). Ciascuna molecola, ionizzata mediante impatto elettronico, si frammenta secondo precise regole di frammentazione, dando luogo a ioni caratteristici che presentano intensità relative tipiche e specifici valori di  $m/z$ . Ciò comporta uno spettro di massa caratteristico di ogni sostanza (impronta digitale), raffrontabile con quelli riportati in apposite 'librerie' e, quindi, tale da consentire una determinazione univoca della sostanza in esame. La tecnica di acquisizione *full-scan* viene, pertanto, adoperata in indagini di tipo qualitativo.

Le indagini quantitative necessitano di maggiore sensibilità, soprattutto nel caso gli analiti vengano estratti da matrici complesse, ricche di composti potenzialmente interferenti. La sensibilità dell'analisi viene incrementata adoperando tecniche di acquisizione differenti, quali SIM ed MS/MS. Entrambe comportano la selezione e l'acquisizione soltanto di pochi ioni caratterizzanti l'analita: in tal modo diminuisce il rumore di fondo, con conseguente

aumento del rapporto segnale/rumore e, quindi, incremento della sensibilità complessiva del metodo.

Fra gli ioni caratteristici è preferibile scegliere -cioè selezionare- lo ione molecolare oppure frammenti corrispondenti a gran parte della molecola. Infatti, molecole appartenenti ad una stessa famiglia di composti avranno una struttura molecolare simile; pertanto la loro frammentazione potrebbe dar luogo a frammenti ionici comuni e quindi poco specifici, soprattutto a bassi valori di  $m/z$ , -come accade nel caso della morfina e del GHB. Al contrario, la selezione e l'acquisizione di ioni ad elevato valore di  $m/z$  mette in luce il differente peso molecolare, garantendo maggiore specificità all'analisi.

Con la modalità di acquisizione MS/MS, lo ione viene non solo selezionato ma anche ulteriormente frammentato e, successivamente, vengono acquisiti unicamente gli ioni prodotto. Tale tecnica, oltre che particolarmente sensibile, risulta altamente specifica. Infatti, anche nel caso in cui una eventuale impurezza dovesse presentare uno ione ad un valore di  $m/z$  uguale a quello dell'analita, avendo struttura molecolare differente, difficilmente l'ulteriore frammentazione dello ione precursore darebbe luogo agli stessi ioni prodotto della sostanza in esame.

I risultati ottenuti durante le analisi dei campioni estratti dalle matrici pilifere e urinarie hanno confermato le considerazioni teoriche precedentemente esposte; pertanto la tecnica analitica proposta in questo lavoro di tesi si è focalizzata sull'utilizzo della spettrometria di massa tandem come metodo di acquisizione nel caso del GHB e del THCCOOH. Questa modalità di acquisizione non è stata adoperata per la morfina e per la cocaina. Le complicazioni osservate sono deputabili alle intensità relative dei picchi molecolari troppo basse, registrati negli spettri di massa *full-scan*, di conseguenza, isolare tali frammenti avrebbe messo in discussione l'univocità delle sostanze nei campioni reali.

La sensibilità dell'analisi può essere ulteriormente migliorata operando in modo tale da ottimizzare la rivelazione degli ioni a valori elevati di  $m/z$  (High Mass Adjustment)<sup>42</sup>. L'High Mass Adjustment consiste in una opportuna variazione delle condizioni di tuning -ovvero dei parametri operativi- dello spettrometro di massa. Tale operazione comporta spettri di massa in cui il pattern di frammentazione della sostanza analizzata non subisce alcuna modifica; mentre vengono incrementate le intensità relative degli ioni presenti a valori elevati di  $m/z$ . L'unico accorgimento necessario per non inficiare la specificità dell'analisi consiste nell'analizzare i

campioni incogniti adoperando sempre le stesse condizioni operative messe a punto durante la costruzione delle rette di taratura.

### *Riproducibilità e affidabilità del metodo*

La validità della metodologia analitica proposta -derivatizzazione BSTFA, separazione gas cromatografica degli analiti e rivelazione mediante spettrometria di massa tandem e SIM a ionizzazione elettronica- è stata verificata attraverso esperimenti tesi ad appurare la riproducibilità e l'accuratezza del metodo. Tale verifica si basa sulla valutazione dei valori di deviazione standard (S.D.), coefficienti di variazione percentuale (CV%) e inaccuratezza percentuale (Inacc.%) ottenuti per ogni analita.

La deviazione standard dipende dalla dispersione delle misure effettuate rispetto al valore medio ed è un indice della ripetibilità della misura, connesso principalmente con l'errore statistico strumentale. Pertanto, non dovrebbe dipendere strettamente dalla concentrazione dell'analita in esame ma essenzialmente dallo strumento di analisi adoperato. Le analisi condotte non hanno confermato l'andamento previsto: le deviazioni standard variano in range molto ampi, indipendentemente dalla concentrazione dell'analita. In effetti tale andamento è deputabile ai lunghi tempi intercorsi tra l'estrazione di un *set* di campioni e l'altra di un altro *set*, evidenziano l'importanza della costruzione di una retta di calibrazione ogni qual volta si presenta la necessità di quantificare la sostanza stupefacente nelle urine e/o nei capelli di un soggetto assuntore di droga, allo scopo garantire l'attendibilità della risposta analitica.

Il coefficiente di variazione è un indice percentuale che correla l'errore della misura al valore medio ottenuto mediante analisi ripetute dello stesso campione. Coefficienti di variazione e deviazione standard forniscono il grado di precisione dell'analisi, cioè danno l'idea di quanto l'analisi risulti riproducibile; mentre l'affidabilità del metodo è valutata calcolando l'inaccuratezza percentuale, che indica il discostamento del valore medio fornito dall'analisi rispetto al valore reale, cioè rispetto alla concentrazione nominale dell'analita rapportato alla concentrazione nominale stessa.

I valori di coefficiente di variazione e inaccuratezza percentuale ottenuti per gli analiti in esame variano in ranges compresi fra 0.9-15.5% (CV%) e  $|0.3-20.0|$  % (Inacc.%) a seconda della concentrazione e rientrano nei parametri comunemente accettati nella validazione delle

metodiche analitiche tese alla quantificazione di sostanze all'interno di matrici biologiche complesse.

#### *Valutazione della linearità della risposta*

Le analisi GC/MS/MS condotte su soluzioni a concentrazioni note e variabili di ciascuna sostanza in esame hanno consentito di correlare l'intensità della risposta (area del picco cromatografico) alla concentrazione nominale degli analiti. Dai risultati ottenuti si è riscontrata una correlazione lineare in tutti quanti i casi.

Il riscontro di una variabilità di risposta in funzione della concentrazione degli analiti rende indispensabile che i valori di concentrazione ritrovati durante le analisi condotte su campioni incogniti ricadano nel range indicato nella curva di calibrazione. Il range considerato nel lavoro finora descritto fa riferimento ai valori di cut-off analitico (che forniscono il limite inferiore alla risposta del dato quantitativo) e ai valori più frequentemente ritrovati nell'analisi di campioni reali (limite superiore).

#### *Analisi di campioni incogniti in matrice urinaria*

Il soggetto 1 e 3 non presentano valori di concentrazione compresi all'interno della curva di calibrazione considerata dell'analita di interesse. In tal caso i soggetti in esame presentano elevati livelli di concentrazione dei metaboliti della cocaina, mentre sono bassi i livelli di sostanza tal quale. Tale positività in matrice urinaria evince un'assunzione avvenuta almeno 7 ore prima del campionamento urinario con ripetuta assunzione della droga. I restanti 5 soggetti presentano concentrazioni di analita che rientrano nella curva di calibrazione e alcuni dei quali hanno concentrazioni molto vicine ai valori di cut-off. Ciò significa che siamo in presenza di assunzioni saltuarie, in particolare per la cocaina e per il THC. Infatti, la presenza dei metaboliti conferma tale ipotesi ed esclude l'eventuale ipotesi di contaminazione ambientale da parte dei soggetti presi in esame.

### *Analisi di campioni incogniti in matrice pilifera*

In tutti i casi in cui l'analisi per l'accertamento di abuso di cocaina è risultata essere positiva (soggetto 2, 3, 4 e 6) i livelli di concentrazione della COC sono sempre superiori rispetto a quelli di BE e EME. Ciò è spiegato considerando che molte sostanze stupefacenti permangono stabilmente nella matrice pilifera senza essere ulteriormente metabolizzate ed eliminate. Inoltre, dai diversi studi condotti sull'incorporazione della cocaina nel pelo si evince che diversi parametri influenzano l'attraversamento delle membrane biologiche da parte delle droghe e quindi il loro assorbimento nel follicolo, come ad esempio la liposolubilità. Infatti, la liposolubilità della cocaina è maggiore rispetto a quella dei suoi metaboliti e ciò consente alla droga parente di essere facilmente accumulata nell'epitelio cellulare rispetto alla BE ed EME, così come confermato dai risultati ottenuti dei soggetti esaminati. La medesima spiegazione è data per i campioni trovati positivi al THCCOOH. La liposolubilità di tale molecola, come per la cocaina, è molto elevata, tanto da precludere una contaminazione.

I metodi proposti per la determinazione delle sostanze stupefacenti e per quelle di nuova denerazione, nei campioni di capelli di tossicomani mostra livelli di elevata sensibilità e specificità, senza sottovalutare altri vantaggiosi aspetti quali rapidità e relativa semplicità dell'analisi. Tutti questi fattori garantiscono l'effettiva applicabilità della metodica proposta e quindi la possibilità di effettuare analisi routinarie di campioni su vasta scala.

Le tecniche adottate si rivelano un proficuo strumento di indagine applicabile agli ambiti più svariati: da quello più vasto della ricerca, teso ad esempio a chiarire i meccanismi di incorporazione delle droghe nelle matrici cheratiniche; a quello sociale riguardante sia studi epidemiologici in diversi campioni di popolazione per stimare la diffusione del fenomeno sia l'applicazione dell'analisi alla terapia di disintossicazione; a quello tossicologico-forense che necessita di validi strumenti di analisi in grado di fornire risultati inequivocabili.



## BIBLIOGRAFIA

1. Schwartz RH, Milteer R, LeBeau MA. Drug-facilitated sexual assault ("date rape"). *South Med J*. 2001; 94 (6): 655-6
2. Stillwell ME. Drug-facilitated sexual assault involving gamma-hydroxybutyric acid. *J Forensic Sci*. 2002; 47(5): 1133-4.
3. Varela M, Nogue S, Oros M, Miro O. Gamma hydroxybutyrate use for sexual assault. *Emerg Med J*. 2004; 21 (2): 255-6.
4. Decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990 n. 309 "Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenze". *Gazzetta Ufficiale* n. 255 del 31 ottobre 1990 - S.O. n. 67
5. [www.governo.it/GovernoInforma/Comunicati/dettaglio.asp](http://www.governo.it/GovernoInforma/Comunicati/dettaglio.asp)
6. M. Caligara, F. Gigli. Il dato quantitativo nell'analisi di sostanze stupefacenti nel capello. Potenzialità e limiti. Relazione tenuta al VII Congresso Nazionale di Tossicologia Forense. Cagliari, 1999; 1-15.
7. Hollister L. in *Farmacologia clinica e generale*. Parte I. Katzung BG. Terza edizione, Piccin, 1998.
8. Bertol E, Mari F, Lodi F, Marozzi E. *Trattato di tossicologia forense*. II edizione (2000), CEDAM.
9. Goodman & Gilman, *Le basi farmacologiche della terapia*. IX edizione (2000), Mc Graw-Hill Libri Italia s.r.l.
10. Silvio Geninatti, Filippo Bellavia, Giovanna Chiappa. Contributo alla definizione di nuove droghe.
11. Nicholson KL, Balster RL. GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend*. 2001 1; 63 (1): 1-22.
12. Bessman SP, Fishbein WN. Gamma-hydroxybutyrate, a normal brain metabolite. *Nature*. 1963; 200: 1207- 8.
13. Ompad DC, Galea S, Fuller CM, Phelan D, Vlahov D. Club drug use among minority substance users in New York City. *J Psychoactive Drugs*. 2004; 36 (3): 397-9
14. <http://www.usdoj.gov/dea/index.htm>
15. Winickoff D. The Icelandic Healthcare Database. *N. Engl. J. Med*. 2000; 343 (23): 1734

16. Zvosec DL, Smith SW, McCutcheon JR, Spillane J, Hall BJ, Peacock EA. Adverse events, including death, associated with the use of 1,4-butanediol. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344 (2): 87-94.
17. <http://www.whitehousedrugpolicy.gov/drugfact/club/index.html> Drug Fact; Office of National Drug Control Policy.
18. Galloway GP, Frederick SL, Staggers FE Jr, Gonzales M, Stalcup SA, Smith DE. Gamma-hydroxybutyrate: an emerging drug of abuse that causes physical dependence. *Add.* 1997; 92 (1): 89-96.
19. Li J, Stokes SA, Woeckener A. A tale of novel intoxication: a review of the effects of gamma-hydroxybutyric acid with recommendations for management. *Emerg. Med.* 1998; 31 (6): 729-36.
20. Li J, Stokes SA, Woeckener A. A tale of novel intoxication: seven cases of gamma-hydroxybutyric acid overdose. *Ann. Emerg. Med.* 1998; 31 (6): 723-8.
21. Kam PC, Yoong FF. Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug. *Anaesthesia.* 1998; 53 (12): 1195-8.
22. Sethy VH, Roth RH, Walters JR, Marini J, Van Woert MH. Effect of anesthetic doses of gamma-hydroxybutyrate on the acetylcholine content of rat brain. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 1976; 295 (1): 9-14.
23. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/>
24. Mamelak M, Escriu JM, Stokan O. The effects of gamma-hydroxybutyrate on sleep. *Biol Psychiatry.* 1977; 12 (2): 273-88.
25. National Institute on Drug Abuse: <http://www.nida.nih.gov/index.html>
26. Vescovi PP, Coiro V. Different control of GH secretion by gamma-amino- and gamma-hydroxy-butyric acid in 4-year abstinent alcoholics. *Drug Alcohol Depend.* 2001; 61 (3): 217-21.
27. Marino A, Costa R. Alcoholism. Aspects of its pharmacology, clinical picture and therapy *Recenti Prog Med.* 1993; 84 (10): 709-21.
28. Steele MT, Watson WA. Acute poisoning from gamma hydroxybutyrate (GHB). *Mo Med.* 1995; 92 (7): 354-7.
29. Lettieri J, Fung HL. Improved pharmacological activity via pro-drug modification: comparative pharmacokinetics of sodium gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1978; 22 (1): 107-18.

30. Bhattacharya I, Boje KM. Feasibility of D-glucuronate to enhance gamma-hydroxybutyric acid metabolism during gamma-hydroxybutyric acid toxicity: pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. *Biopharm Drug Dispos.* 2006; 28 (1): 1-11.
31. Lingenhoehl K, Brom R, Heid J, Beck P, Froestl W, Kaupmann K, Bettler B, Mosbacher J. Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors. *Neuropharmacology.* 1999; 38 (11): 1667-73.
32. Drug Enforcement Administrations Congressional finding; emergency scheduling of ghb in controlled substances act. Pub. L. 106-172, Sec. 2, 3 (a), Feb. 18, 2000, 114 Stat. 7, 8, provided that: TITLE 21 - Food and Drugs Chapter 13 - drug abuse prevention and control subchapter - control and enforcement Part B - Authority To Control; Standards and Schedules. Sec. 812. Schedules of controlled substances: <http://www.usdoj.gov/dea/pubs/csa/812.htm>
33. <http://www.politicheantidroga.it/site/it-IT/> Osservatorio Europeo sulle Droghe e le Tossicodipendenze
34. Lafisica S, Tagliaro F, Maschio S, Capra F, Neri C, Marigo M. Determinazione della morfina nei capelli: confronti tra metodi RIA e HPLC. *Riv. It. Med. Leg.* VIII, 1986: 485-495.
35. Phillips DL, Tebbett IR, Bertholf RL. Comparison of HPLC and GC-MS for measurement of cocaine and metabolites in human urine. *Jurnal of anlytical toxicology*, 20, 1996, pp. 305-308.
36. Manno JE, Manno BR, Kemp PM, Alford DD, Abukhalaf IK, McWilliams ME, Hagaman FN, Fitzgerald MJ. Temporal indication of marijuana use can be estimated from plasma and urine concentrations of delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta9-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid. *J Anal Toxicol.* 2001; 25 (7): 538-49.
37. Villain M, Cirimele V, Ludes B, Kintz P. Ultra-rapid procedure to test for gamma-hydroxybutyric acid in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 792 (1): 83-7.
38. Baumgartner WA, Hill VA, Blahd WH. Hair analysis for drugs of abuse. *Journal of Forensic Sciences.* 1989 (34): 1433-1453.
39. Girod C, Staub C. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Science International.* 2000 (107): 261-271.

40. Du Pont RL, Baumgartner WA. Drug testing by urine and hair analysis: complementary features and scientific issues. *Forensic Science International*. 1995; 70: 63-76.
41. Da Matta Chasin AA, Midio AF. Validation of an ion-trap gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of cocaine and metabolites and cocaethylene in post mortem whole blood. *Forensic Science International*. 2000; 109: 1-13.
42. Blank DL, Kidwell DA. Decontamination procedures for drugs of abuse in hair: are they sufficient? *Forensic Science International*. 1995; 70: 13-38.
43. Wilkins D, Haughey H, Cone E, Huestis M, Foltz R, Rollins D. Quantitative analysis of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in human hair by negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 1995; 19 (6): 483-91.
44. Goullé JP, Chèze M, Pépin G. Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *J Anal Toxicol*. 2003; 27 (8): 574-80.
45. [www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm) Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation.
46. Villavecchia GV, *Trattato di chimica analitica applicata*, Hoepli, Milano (1967).
47. Majors RE, *Cromatografia in fase solida e liquida*, in *Analisi Strumentale*, Bauer-Christian-O'Reilly, Editors, Piccin Nuova Libreria Spa, Padova (1985), cap. 21;
48. Littlewood AB, *Gas Chromatography: principles, techniques and applications*, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, New York (1970).
49. Watson JT, *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy*, in *Ancillary Techniques for Gas Chromatography*, Ettre LS and McFadden WM, Editors, Wiley-Interscience, New York, 1969: 145.
50. Mann M, Meng CK, Fenn JB, *Electrospray Ionization for mass spectrometry of large biomolecules*, *Anal. Chem.* (1989), 246: 64.

## ABBREVIAZIONI

|                        |   |
|------------------------|---|
| DEA                    | DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION   |
| D.P.R.                 | DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA   |
| OEDT                   | OSSERVATORIO EUROPEO SULLE DROGHE E LE TOSSICODIPENDENZE  |
| ONDCP                  | OFFICE OF NATIONAL DRUG CONTROL POLICY  |
| NIDA                   | NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE  |
| FDA                    | FOOD AND DRUG ADMINISTRATION  |
| $\Delta^9$ -THC        | $\Delta^9$ -TETRAIDROCANNABINOLO  |
| THCCOOH                | ACIDO TETRAIDROCANNABINOLO  |
| THCCOOH d <sub>3</sub> | ACIDO TETRAIDROCANNABINOLO DEUTERATO  |
| COC                    | COCAINA   |
| BE                     | BENZOILECGONONA   |
| EME                    | ECGONINAMETILESTERE   |
| MOR                    | MORFINA   |
| COD                    | CODEINA   |
| GHB                    | ACIDO $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO  |
| GHBd <sub>6</sub>      | ACIDO $\gamma$ -IDROSSIBUTIRRICO DEUTERATO  |
| L/L                    | LIQUIDO/LIQUIDO   |
| SPE                    | SOLID PHASE EXTRACTION, ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA   |
| GC                     | GAS CROMATOGRAFIA   |
| HPLC                   | HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI   |
| MS                     | MASS SPECTROMETRY, SPETTROMETRIA DI MASSA   |
| TIC                    | TOTAL ION CURRENT, CORRENTE IONICA TOTALE   |
| SIM                    | SELECTED ION MONITORING, SCANSIONE DI IONI SELEZIONATI  |
| MS-MS                  | SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM   |
| MS <sup>N</sup>        | SPETTROMETRIA DI MASSA MULTISTADIO  |
| MS-MS(SRM)             | TANDEM MASS SPECTROMETRY WITH SELECTED REACTION MONITORING, SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM CON REGISTRAZIONE DI UNA REAZIONE SELEZIONATA |
| EI                     | ELECTRONIC IONIZATION, IONIZZAZIONE ELETTRONICA   |
| GC/MS                  | GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA  |
| GC/MS-MS               | GAS CROMATOGRAFIA/SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM   |
| LC/MS                  | Cromatografia Liquida/Spettrometria di Massa  |
| R <sup>2</sup>         | COEFFICIENTE DI DETERMINAZIONE  |
| DS%                    | DEVIAZIONE STANDARD PERCENTUALE   |
| %DIFF                  | COEFFICIENTE DI INACCURATEZZA PERCENTUALE   |
| CV%                    | COEFFICIENTE DI VARIAZIONE PERCENTUALE  |